

# 乳粉中维生素检测标准菌接种培养时间研究

张雅伦, 张 涛, 陈 晨, 刘红冉, 张 薇, 杨 岚, 周 巍\*

(河北省食品检验研究院, 河北省食品安全重点实验室, 石家庄 050071)

**摘 要:** **目的** 探究乳粉中维生素检测标准菌在接种前的最佳培养时间。**方法** 测定标准菌的不同培养时间下的紫外吸收值, 分析得出生长曲线来确定标准菌最佳接种时期。**结果** 泛酸、生物素和维生素 B<sub>12</sub> 标准菌最佳接种培养时间为 16 h, 叶酸标准菌为 14 h。接种培养时间远低于现行标准规定时间, 且叶酸标准菌活性和活菌数量随时间延长明显下降, 其他标准菌也有所减弱。**结论** 通过缩短接种前的培养时间, 提高后续奶粉检测的准确性, 减少因标准菌接种状态带来的不利影响。

**关键词:** 维生素; 标准菌; 生长曲线; 接种培养时间

## Study on the inoculation and culture time of vitamin test standard bacteria in milk powder

ZHANG Ya-Lun, ZHANG Tao, CHEN Chen, LIU Hong-Ran, ZHANG Wei,  
YANG Lan, ZHOU Wei\*

(Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Food Safety Key Laboratory, Shijiazhuang 050071, China)

**ABSTRACT: Objective** To explore the optimal culture time of vitamin test standard bacteria in milk powder before inoculation. **Methods** Ultraviolet Spectrophotometer absorption values of standard bacteria at different culture time were determined, and growth curves were obtained to determine the optimal inoculation time of standard bacteria. **Results** The optimal inoculation and culture time of pantothenic acid, biotin and vitamin B<sub>12</sub> standard bacteria was 16 h and folic acid standard bacteria was 14 h. The inoculation and culture time was much lower than the current standard, and the activity of folic acid standard bacteria and the number of live bacteria decreased obviously with the extension of time, and other standard bacteria also weakened. **Conclusion** By shortening the culture time before inoculation, improving the accuracy of subsequent milk powder testing and reducing the adverse effects caused by the inoculation status of standard bacteria.

**KEY WORDS:** vitamin; standard bacteria; growth curve; inoculation and culture time

## 1 引 言

婴幼儿配方奶粉是以母乳为标准, 含有满足婴幼儿正常的营养需求的成分和含量, 它是以牛奶为基础全面升

级改造的奶制品<sup>[1]</sup>。大部分的奶粉企业根据婴幼儿不同月龄成长的营养需要, 调节了必需亚油酸、微量元素、蛋白质、糖类营养素的比比例促进婴儿快速发育成长<sup>[2]</sup>。维生素是人体所必需的六大营养素的一种, 是维持人体正常

基金项目: 科技部“食品安全关键技术研发”重点专项项目(2017FYC1601400)、河北省人才工程培养资助项目(A201905002)

Fund: Supported by the Special Program for Key Technology in Food Safety of the Ministry of Science and Technology of China (2017FYC1601400), Hebei Province Talent Engineering Training Funding Project (A201905002)

\*通讯作者: 周巍, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: zhouwei0311@163.com

\*Corresponding author: ZHOU Wei, Professor, Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Food Safety Key Laboratory, Shijiazhuang 050071, China. E-mail: zhouwei0311@163.com

机能的主要成分,同时也是促进婴幼儿健康成长不可或缺的部分<sup>[3-5]</sup>,但过量的维生素摄入也会对婴幼儿造成毒害作用,所以在婴幼儿配方奶粉中维生素的添加用量是至关重要的<sup>[6,7]</sup>。因此,食品安全国家标准中关于婴幼儿配方奶粉中的叶酸、泛酸、生物素、维生素 B<sub>12</sub> 含量检测的相关标准有着重要作用,它不仅是企业生产所参考的准则,更是从事食品安全工作人员在监督工作中的主要参考依据<sup>[8]</sup>。现行标准中,微生物检验有着较高的精确性,但在检验工作中存在的局限性(重复性差、检验周期长等)也有待改进<sup>[9,10]</sup>。乳粉中维生素含量的现行标准是通过各自标准菌生长来测定,这也就意味着测定所用接种的标准菌活性和数量,对检验工作意义重大,所以对标准菌生长状态研究是不可缺少的。聂炎炎等<sup>[11]</sup>在检测生物素含量时,将活化的标准菌冻存于 96 孔板中,减少传代接种时菌不利状态对检测的影响,但没有对冻存前标准菌培养条件进一步研究。周敏等<sup>[12]</sup>在检测生物素含量时,使用已经包被好标准菌的微孔板试剂盒来减少接种不利影响,但试剂盒的储存条件对标准菌活性有较大影响。由此可以得知,标准菌接种状态对后续维生素检验有着重要影响。

本研究中,标准菌培养不同时间后,通过紫外分光光度计测定分析得到生长曲线,来选择标准菌最佳接种时期,因为对数期菌活性最高,避免出现之后稳定期和衰亡期死菌影响读数情况,并通过对生长曲线的研究,减少因培养时间过长导致菌活性和数量下降,从而带来的不利接种状态对后续维生素检验工作的造成准确性差和重现性差等影响,以期在一定程度上解决维生素检验时间周期长的问题。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

菌株: 莱士曼氏乳酸杆菌(维生素 B<sub>12</sub> 标准菌)ATCC 7830、鼠李糖乳杆菌(叶酸标准菌)ATCC 7469、植物乳杆菌(生物素标准菌、泛酸标准菌)ATCC 8014 标准菌种(中国工业微生物菌种保藏中心)。

培养基: 乳酸杆菌琼脂培养基、乳酸杆菌肉汤培养基、叶酸测定培养基(北京陆桥生物技术有限责任公司)。

试剂: 叶酸标准品(纯度大于 99%, 美国 Sigma 公司); 氢氧化钠(分析纯, 天津市永大化学试剂有限公司); 乙醇(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司)。

### 2.2 仪器与设备

ME204/02 电子分析天平为(上海梅特勒-托利多公司); 1-15pk 离心机(美国 Sigma 公司); MIR-254 低温恒温培养箱(河北万铭通达科技有限公司); UV-2700 紫外分光光度仪(日本岛津公司)。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 培养

将各储备标准菌接种于琼脂培养基进行培养,将培养好的植物乳杆菌和莱士曼氏乳酸杆菌分别接种到装有 20 mL 灭菌的乳酸杆菌肉汤培养基的试管中,将培养好的鼠李糖乳杆菌接种到装有 20 mL 灭菌的按照 2 mL 泛酸标准工作溶液(0.2 ng/mL)和 4 mL 泛酸测定用培养液比例配置培养基的试管中,试管按照空白、0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 进行标号分组,同时每个编号需要 3 个平行,密封放入恒温培养箱中分别按照莱士曼氏乳酸杆菌 36 °C,鼠李糖乳杆菌和植物乳杆菌 37 °C,培养 24 h。

### 2.3.2 测定

将空白标号管作为对照,将相应标号管在培养箱中培养相应时间取出,在漩涡振荡器混匀,放入比色皿中,在波长 550 nm 下进行读数。平行的 3 个管之间相对偏差小于 15%为有效数值,记录数值平均数作图为该菌的生长曲线。

## 3 结果与分析

以该菌生长时间为横坐标,吸光度值为纵坐标,将有效测量的 3 个数值取平均值,平均值的变化趋势即为该菌的生长曲线图。

微生物在对数期生长时其活性是最强的,也接种最佳时刻,当进入稳定期后一段时间微生物生理形态都会发生改变,出现衰亡,极大的影响接种效率。由数据可以得知(表 1、表 2、表 3),莱士曼氏乳酸杆菌和植物乳杆菌菌数达到最大值,也是活性最强的时候为 16 h 左右,而鼠李糖乳杆菌菌数和活性达到最大值为 14 h 左右。而且,鼠李糖乳杆菌在 16 h 后的菌数有明显的下降,其他两种菌的菌数也成缓慢下降趋势,这说明随着时间的延长,活菌数和菌的活性都在不断地下降,尤其是鼠李糖乳杆菌,标准中给出的菌接种前所需的培养时间 20~24 h 大大超出了最佳接种时间,这导致后续奶粉测量不利的影响,所以重新选择接种菌的培养时间有着重要意义。

## 4 结论与讨论

本文通过对奶粉标准中维生素测定的标准菌生长曲线的研究,来提高后续奶粉检测的准确性,减少因标准菌接种状态带来的不利影响。当奶粉中维生素含量检验时,接种的标准菌的活性的高低和活菌数量多少是关键,本研究通过一系列标准菌培养时间和吸光值的关系,得到了各标准菌的生长曲线,通过分析本研究得知莱士曼氏乳酸杆菌(维生素 B<sub>12</sub> 标准菌)和植物乳杆菌(生物素标准菌、泛酸标准菌)达到菌数和活力最好时期为 16 h,鼠李糖乳杆菌

表 1 莱士曼氏乳酸杆菌不同生长时间吸光值

Table 1 Absorbance value of *Lactobacillus leichmannii* at different growth time

培养时间/h	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
吸光值 1	0.013	0.011	0.037	0.128	0.321	0.541	0.738	0.766	0.879	0.780	0.864	0.858	0.822
吸光值 2	0.011	0.012	0.034	0.122	0.303	0.570	0.726	0.742	0.831	0.810	0.816	0.831	0.805
吸光值 3	0.012	0.011	0.036	0.119	0.343	0.554	0.698	0.826	0.903	0.864	0.873	0.835	0.861
平均值	0.012	0.011	0.036	0.123	0.322	0.555	0.721	0.778	0.871	0.818	0.851	0.841	0.829

表 2 鼠李糖乳杆菌不同生长时间吸光值

Table 2 Absorbance value of *Lactobacillus rhamnosus* at different growth time

培养时间/h	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
吸光值 1	0.003	0.008	0.031	0.174	0.362	0.448	0.567	0.583	0.567	0.499	0.491	0.506	0.496
吸光值 2	0.002	0.008	0.031	0.165	0.331	0.516	0.568	0.594	0.589	0.509	0.489	0.488	0.488
吸光值 3	0.001	0.009	0.034	0.191	0.359	0.507	0.523	0.620	0.565	0.524	0.536	0.480	0.495
平均值	0.002	0.008	0.032	0.177	0.351	0.490	0.553	0.599	0.574	0.511	0.505	0.491	0.493

表 3 植物乳杆菌不同生长时间吸光值

Table 3 Absorbance value of *Lactobacillus plantarum* at different growth time

培养时间/h	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
吸光值 1	0.007	0.020	0.043	0.150	0.654	1.075	1.091	1.163	1.092	1.048	1.143	1.063	1.062
吸光值 2	0.007	0.017	0.044	0.148	0.642	0.982	1.043	1.081	1.141	1.192	1.118	1.043	1.161
吸光值 3	0.006	0.017	0.041	0.147	0.662	0.967	1.105	1.091	1.183	1.074	1.030	1.154	1.043
平均值	0.007	0.018	0.043	0.148	0.653	1.008	1.080	1.112	1.139	1.105	1.097	1.087	1.089

(叶酸标准菌)为 14 h,且随着时间的延长,菌的状态和活菌数量都在不断地下降,尤其是鼠李糖乳杆菌发生明显变化,所以标准中给出鼠李糖乳杆菌接种培养时间 20~24 h 大大超出了本研究测定出来的最佳时期,接种时菌的不利状态会降低后续检验结果的准确性和重复性。现行标准为广泛使用给出的接种培养时间范围较大,加大时间范围给检测带来操作空间更大,同时如叶酸标准冻干活化和接种活化为相同时间范围,其他标准菌活化时间和最终检验培养时间较为一致,减少了操作流程的差异,方便检验工作,但接种培养时间的加长,会对后续检验带来不利影响。通过缩短接种前的培养时间,达到最佳接种时期来提高菌的活力和数量,使接种时菌达到最好状态,提高检验的准确性。

同时,本研究也验证 4 项维生素后续检测所需达到稳定的时间,所得到莱士曼氏乳酸杆菌、植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌都在 18 h 后吸光度值趋于稳定,可以进行后续分析检验。这和标准中给出的维生素 B<sub>12</sub> 标准菌的培养时间为(36±1) °C 培养 19~20 h,叶酸标准菌的培养时间(37±1) °C 培养 20~40 h,泛酸标准菌的培养时间(37±1) °C 培养 16~20 h,生物素标准菌的培养时间(37±1) °C 培养 19~20 h,相符<sup>[13-16]</sup>。

综上,随着人们的食品安全意识不断地提升,食品检验方式也在不断地完善,只有不断地细化检验准则,提高检验准确性,才能加强我国对食品行业的监管,让人民吃上放心食物,让婴幼儿喝上放心奶粉。

#### 参考文献

- [1] Yonekubo A. Lipids in breast milk and infant formula, and lipid nutrition [J]. *Fish Sci*, 2011, 68(2): 1422-1425.
- [2] 汪焕林,冯瑞琴. 红外光谱技术在奶粉质量检测中的应用[J]. *甘肃联合大学学报*, 2009, 23(1): 55-58.  
Wang HL, Feng RQ. Application of infrared spectroscopy in quality testing of milk powder [J]. *J Gansu Lianhe Univ*, 2009, 23(1): 55-58.
- [3] 史敏. 浅谈婴幼儿配方奶粉中维生素 E 的检测方法及其稳定性[J]. *科学之友*, 2013, (1): 118-119.  
Shi M. Discussion on the detection method and stability of vitamin E in infant formula milk powder [J]. *Friends Sci*, 2013(1): 118-119.
- [4] 蔡翔宇,吴玉杰. 奶粉中多种维生素同时测定方法的研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2016, (2): 154-157.  
Cai XY, Wu YJ. Research progress in simultaneous determination of multivitamins in milk powder [J]. *China Food Addit*, 2016, (2): 154-157.
- [5] Sheng JL, Dan HL, Ming XS, et al. Lack of association between serum vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub>, and vitamin D levels with different types of glaucoma: A systematic review and meta-analysis [J]. *Nutrients*, 2017,

- 9(6): 636.
- [6] 孙立华. 维生素过量危害大[J]. 食品与健康, 2006, (9): 12-12.  
Sun LH. Excessive vitamin exposure [J]. Food Health, 2006, (9): 12-12.
- [7] 于之瑶, 孙贵范. 维生素在高血压防治中的作用研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(11): 1031.  
Yu ZY, Sun GF. Research progress of the role of vitamins in prevention and treatment of hypertension [J]. J Environ Health, 2015, 32(11): 1031.
- [8] 阙肖英. 食品安全监督过程中卫生标准的应用探讨[J]. 中国标准化, 2017, 24.  
Yan XY. Discussion on the application of health standards in food safety supervision process [J]. China Standardization, 2017, 24.
- [9] 毛伟贞. 维生素的国际标准检测方法研究[J]. 中国高新技术企业, 2012, (14): 34-35.  
Mao WZ. Research on international standard test methods for vitamins [J]. China High-Tech Enterp, 2012, (14): 34-35.
- [10] 秦磊磊, 陈绪华, 刘健, 等. 微生物法测定婴幼儿奶粉中游离生物素条件优化[J]. 现代农业科技, 2013, (15): 296-297.  
Qin LL, Chen XH, Liu J, *et al.* Optimization of free biotin conditions in infant formula by microbiological method [J]. Mod J Agric Sci Technol, 2013, (15): 296-297.
- [11] 聂炎炎, 刘冬虹, 吴环, 等. 婴幼儿配方奶粉中生物素含量的快速微生物检测方法研究[J]. 检验检疫学刊, 2014, (6):36-38.  
Nie YY, Liu DH, Wu H, *et al.* Rapid microbial detection method for biotin content in infant formula milk powder [J]. J Inspect Quarant, 2014, (6): 36-38.
- [12] 周敏, 许再元, 苏水娇, 等. 微孔板试剂盒法测定婴幼儿配方奶粉中的生物素含量[J]. 浙江农业科学, 2017, 58(12): 2246-2248.  
Zhou M, Xu ZY, Su SJ, *et al.* Determination of biotin content in infant formula by microplate kit method [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2017, 58(12): 2246-2248.
- [13] GB 5413.14-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 B<sub>12</sub> 的测定[S].  
GB 5413.14-2010 National food safety standard—Determination of vitamin B<sub>12</sub> in infant foods and dairy products [S].
- [14] GB 5009.211-2014 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定[S].  
GB 5009.211-2014 National food safety standard—Determination of folic acid in food [S].
- [15] GB 5009.210-2016 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定[S].  
GB 5009.210-2016 National food safety standard—Determination of pantothenic acid in food [S].
- [16] GB 5009.259-2016 食品安全国家标准 食品中生物素的测定[S].  
GB 5009.259-2016 National food safety standard—Determination of biotin in food [S].

(责任编辑: 王 欣)

### 作者简介



张雅伦, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全。  
E-mail: 1149040513@qq.com



周 巍, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全。  
E-mail: zhouwei0311@163.com