

微生物法检测叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 接种液 制备方法的优化

黄进丽, 杨祖伟, 陈叶兰, 陈绮梦, 叶少文, 苏昭仑, 李 珍*, 魏鲜娥*

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519000)

摘要: **目的** 解决使用微生物法 GB 5009.211-2014、GB 5009.259-2016、GB 5413.14-2010 检测食品中叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 接种液制备耗时长的的问题。**方法** 将标准方法制备的接种液与甘油水按 1:1(V:V)比例混匀, 分装于小离心管, -80 °C 冻存。再通过用冻存不同时间的接种液检测样品, 分析标准曲线线性、中间精密度和加标回收率来验证制备方法的适用性。**结果** 标准曲线线性关系 r^2 均 > 0.99, 中间精密度叶酸 RSD 为 1.5%~3.2%, 生物素 RSD 为 1.7%~4.2%, 维生素 B₁₂ RSD 为 2.5%~9.3%; 回收率方面, 叶酸为 99.5%~101.0%, 生物素 98.6%~101.3%, 维生素 B₁₂ 90.3%~96.4%。鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌、莱氏曼氏乳杆菌接种液超低温冻存有效时间长分别为 6、8、3 个月。**结论** 优化后的接种液制备方法缩短了检测周期, 操作简便、方法可靠, 适合检测使用。

关键词: 微生物法; 接种液; 叶酸; 生物素; 维生素 B₁₂

Optimization of preparation method of inoculating solution for microbial detection of folic acid, biotin and vitamin B₁₂

HUANG Jin-Li, YANG Zu-Wei, CHEN Ye-Lan, CHEN Qi-Meng, YE Shao-Wen,
SU Zhao-Lun, LI Zhen*, WEI Xian-E*

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519000, China)

ABSTRACT: Objective To solve the problem of time consuming in preparing the inoculum for the detection of folate, biotin and vitamin B₁₂ in food by microbiological method GB 5009.211-2014, GB 5009.259-2016, GB 5413.14-2010. **Methods** Mix the inoculum prepared by the standard method with glycerin water in a ratio of 1:1(V:V), dispense into a small centrifuge tube, and freeze at -80 °C. The applicability of the preparation method was verified by detecting samples with different time of cryopreservation, analyzing the linearity of the standard curve, the intermediate precision of the test results and the spike recovery rate of standard addition. **Results** Standard curve linear relationship $r^2 > 0.99$. The intermediate precision of folic acid, biotin and vitamin B₁₂ were 1.5%–3.2%, 1.7%–4.2%, 2.5%–9.3%, respectively. The recovery of folic acid was 99.5%–101.0%, biotin 98.6%–101.3%, vitamin B₁₂ 90.3%–96.4%. The effective time of cryopreservation of *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus lehmannii* inoculums were 6, 8, 3 months, respectively. **Conclusion** The optimized preparation method of inoculum shortens detection period, is reliable

*通讯作者: 李珍, 工程师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 362178337@qq.com;

魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 176019964@qq.com

*Corresponding author: LI Zhen, Engineer, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 362178337@qq.com
WEI Xian-E, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 176019964@qq.com

and easy to operate, and is suitable for testing.

KEY WORDS: microbial method; inoculum; folic acid; biotin; vitamin B₁₂

1 引言

叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 常用的含量检测方法有高效液相色谱法^[1-3]、液质联用法^[4-6]、微生物法^[7,8]和基于微生物法原理的试剂盒法^[9-11]。高效液相色谱法等仪器法因为操作简便,重现性较好,但不适用于基质复杂的乳制品。而微生物法由于具备高灵敏度,不易受样品本身复杂基质的干扰,在食品检测中具有非常重要的作用,成为乳制品中微量维生素的常用检测方法。目前食品安全标准中,3种维生素标准方法均为微生物法,分别为 GB 5009.211-2014《食品安全国家标准 食品中叶酸的测定》^[12]、GB 5009.259-2016《食品安全国家标准 食品中生物素的测定》^[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 B₁₂的测定》^[14]。

在食品中微生物法检测低含量维生素具有独到的优势,但同时存在检测周期长、操作繁杂等劣势。3种维生素检测接种液制备方法存在步骤复杂缺点,制备过程耗时 4~5 d 是检测周期长的主因,同时还存在由于屡次传代导致的菌株活力稳定性较差,易受外部干扰等问题^[15]。目前很多实验室由于样品量较大,大多数采用包被有菌株的 96 孔板试剂盒检测维生素,操作简单,菌液可随时使用,但是价格昂贵,成本较高,很多企业难以承受。为此,本研究是在国家标准方法的基础上,对接种液制备方法进行优化,以期找到成本低廉,简便快捷的方式,为同行技术人员在快速检测大批量样品提供参考。

2 材料与方 法

2.1 实验材料与设备

2.1.1 标准菌株

叶酸测试用菌(CICC6224,中国工业微生物菌种保藏管理中心);生物素测试用菌(GIM1.140,广东省微生物菌种保藏中心);维生素 B₁₂测试用菌(GIM1.823,广东省微生物菌种保藏中心)。

2.1.2 培养基和试剂

叶酸测定用培养基(青岛海博生物科技有限公司);生物素和维生素 B₁₂测定用培养基(美国 BD 公司);MRS 肉汤培养基(北京陆桥技术股份有限公司);乳酸杆菌肉汤培养基(青岛海博生物科技有限公司)。

甘油(100%)、氯化钠(分析纯,国药集团);

60%甘油水: 60 g 甘油加水至 100 mL,混匀 121 °C 灭菌 15 min;

0.85%生理盐水: 0.85 g 氯化钠加水至 100 mL,混匀

分装,121 °C 灭菌 15 min。

2.1.3 仪器设备

BSC-1600IIA2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);SPX-250BSH-II 恒温培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);UV2600 紫外分光光度计(日本岛津仪器有限公司);DW-86L490 超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司);HBPT001-1 磁珠菌种保存管(青岛海博生物科技有限公司);2 mL 无菌离心管(美国 Crystalgen 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 鼠李糖乳杆菌接种液的制备和保存

将用磁珠保存的鼠李糖乳杆菌储备菌种接种至 MRS 肉汤培养基中 37 °C 培养 20~24 h,连续传代 2~3 代以活化菌株。按 GB 5009.211-2014 方法制备接种液,接种液浊度调至与标准 2 号麦氏比浊管相当,将制备好的接种液与 60% 无菌甘油水按 1:1(V:V)比例充分混匀,分装多支小离心管,每管 2 mL,-80 °C 超低温冰箱保存。每次试验取出一支冻融后用 0.85% 生理盐水稀释使用。

2.2.2 植物乳杆菌接种液的制备和保存

将用磁珠保存的植物乳杆菌储备菌株接种至 MRS 肉汤培养基中 37 °C 培养 20~24 h,连续传代 2~3 代以活化菌株。按 GB 5009.259-2016 方法制备接种液,接种液浊度调至与标准 2 号麦氏比浊管相当,将制备好的接种液与 60% 甘油水按 1:1(V:V)比例充分混匀,分装多支小离心管,每管 1 mL,-80 °C 超低温冰箱保存。每次试验取出一支冻融后用 0.85% 生理盐水稀释使用。

2.2.3 莱氏曼氏乳杆菌接种液的制备和保存

将用磁珠保存的莱氏曼氏乳杆菌储备菌株接种至乳酸杆菌肉汤培养基中 37 °C 培养 20~24 h,连续传代 2~3 代以活化菌株。按 GB 5413.14-2010 方法制备接种液,接种液浊度调至与标准 2 号麦氏比浊管相当,将制备好的接种液与 60% 甘油水按 1:1(V:V)比例充分混匀,分装多支小离心管,每管 2 mL,-80 °C 超低温冰箱保存。每次试验取出一支冻融后用 0.85% 生理盐水稀释使用。

2.2.4 样品处理分析

搜集不同配方、具备低含量叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 的乳清蛋白粉产品 6 份,低温保存。每隔 1 个月取样,分别按 GB 5009.211-2014、GB 5009.259-2016、GB 5413.14-2010 进行样品处理,然后用按 2.2.1、2.2.2、2.2.3 制备的冻存不同时间段的接种液进行接种,对样品中的叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 进行检测,分析标准曲线线

性, 中间精密度、加标回收率。

3 结果与分析

3.1 接种液制备的优化

标准方法 GB 5009.211-2014、GB 5009.259-2016、GB 5413.14-2010 中接种液的制备, 实验前需将储备菌株连续传种 2~3 代保证细菌活力(耗时 3~4 d), 活化后的菌株再接种至乳酸杆菌肉汤培养基中 36 °C 培养 18~24 h 后, 取出后将菌悬液离心弃去上清液, 再用 0.85% 无菌生理盐水振荡均匀并离心弃去上清液, 如此用 0.85% 无菌生理盐水重复清洗 3 次, 最后用 0.85% 生理盐水稀释至透光率 80% 左右才能使用。完成接种液制备, 整个过程需要耗时 4~5 d, 操作繁琐, 制备时间长, 再加上样品培养时间和培养物吸光度测定, 完成一批样品检测总耗时 6~7 d。检验时间过长, 不利于大批量、任务紧急的检测。

本研究方法是分别将标准方法制备好的接种液和甘油混匀后分装小离心管多支, 于 -80 °C 超低温保存, 其中甘油作为防冻剂防止冰晶对细胞造成伤害。每次试验时只需要拿出一支冻融后, 用生理盐水稀释至适当浓度直接作为工作接种液使用。

3.2 标准曲线

按照 2.2.4 的处理方式, 汇总叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 每月检测的标准曲线相关系数 r^2 。汇总如表 1, 从表 1 数据来看, 叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 分别在 6、8、3 个月内标准曲线相关系数 r^2 均 > 0.99, 曲线拟合良好, 满足 GB/T 27404 要求。表明按照 2.2.1、2.2.2、2.2.3 方式分别制备保存的鼠李糖乳杆菌接种液、植物乳杆菌接种液、莱氏曼氏乳杆菌接种液, 菌种活力保持稳定, 适合检测要求。

3.3 中间精密度

0 月用样品按照标准方法检测, 后每月所取样品按照 2.2.4 处理方式检测。汇总叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 结果, 计算 RSD 值, 如表 2~4 所示。结果显示不同样品在不同时间段的叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 的 RSD 值分别为 1.5%~3.2%、1.7%~4.2%、2.5%~9.3%, 均满足 GB/T 27404 要求。表明按照 2.2.1、2.2.2、2.2.3 方式分别制备保存的鼠李糖乳杆菌接种液、植物乳杆菌接种液、莱氏曼氏乳杆菌接种液, 面对不同样品适用性良好, 检测结果等同于按照标准方法制备的接种液。

3.4 加标回收率

选取乳清蛋白粉产品 1 作为试验样品, 称取样品量为 2 g, 在样品稀释液中加入不同浓度的叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 对照溶液进行 3 次重复加标回收试验, 用本研究中保存时间极限月份的接种液进行接种检测。试验结果如表

5 所示, 叶酸、生物素、维生素 B₁₂ 回收率为别为: 99.5%~101.0%、98.6%~101.3%、90.3%~96.4%, 满足 GB/T 27414 要求。表明按照 2.2.1、2.2.2、2.2.3 方式分别制备保存的鼠李糖乳杆菌接种液、植物乳杆菌接种液、莱氏曼氏乳杆菌接种液进行检测, 结果准确性良好。

3.5 接种液保存时间

经过 3.2 和 3.3 线性分析和样品重现性分析的试验数据, 分别得出用本方法制备的 3 种接种液有效保存时间, 如表 6。接种液在该保存时间内, 菌株满足检测要求。

4 结论与讨论

按照标准方法 GB 5009.211-2014、GB 5009.259-2016、GB 5413.14-2010 操作, 接种液制备方式复杂, 耗时长, 一个月内菌株多次传代和菌株活力不稳定, 易受外部因素干扰等诸多问题。由于试验菌株是维生素试验的关键, 如此制备试验菌株容易导致每次试验稳定性不可控。

本研究将鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌、莱氏曼氏乳杆菌分别按标准方法制备好接种液, 与甘油混合后分装多支, 预先 -80 °C 冻存于 2.0 mL 无菌小离心管, 利用甘油有效保护冷冻的菌种, 达到了制备一次菌液可多次使用的目的。通过对本研究方法标准曲线相关系数、中间精密度、加标回收率等各参数的试验, 结果表明接种液分别在 6、8、3 个月时间段内活力稳定可控, 在此时间段内实验效果等同于标准菌株的首次使用。因此, 优化后方法接种液可随时使用, 操作步骤简单, 减少了标准方法每次实验前 4~5 d 的菌液制备时间, 实现来样当天检测, 检测周期也由 6~7 d 缩减至 2~3 d, 在实际工作中大大提高了实验的效率, 达到降低检验成本和快速检测的要求, 适合在实验室推广和使用。

表 1 不同保存时间段标准曲线相关系数 r^2
Table 1 Correlation coefficient r^2 of standard curve for different storage periods

编号	叶酸	生物素	维生素 B ₁₂
	相关系数 r^2	相关系数 r^2	相关系数 r^2
0 月	0.9988	0.9992	0.9978
1 月	0.9982	0.9990	0.9976
2 月	0.9990	0.9986	0.9945
3 月	0.9965	0.9992	0.9965
4 月	0.9976	0.9986	0.9892
6 月	0.9988	0.9993	/
8 月	0.9886	0.9985	/
9 月	/	0.9899	/

注: / 表示无。

表 2 叶酸中间精密度结果($n=6$)
Table 2 Folate intermediate precision results ($n=6$)

编号	叶酸含量/($\mu\text{g}/100\text{g}$)								平均值	RSD/%
	0月	1月	2月	3月	6月	8月				
产品 1	118.2	116.5	120.5	125.2	124.2	--	--	120.7	2.8	
产品 2	160.2	160.8	165.2	158.2	159.5	--	--	161.1	1.5	
产品 3	136.5	140.2	138.6	142.5	145.8	--	--	140.4	2.4	
产品 4	220.2	215.3	220.3	218.2	212.3	--	--	217.8	1.5	
产品 5	180.5	175.2	170.6	176.9	178.6	--	--	177.4	2.3	
产品 6	90.2	89.2	92.5	91.6	95.2	--	--	90.9	3.2	

注: --表示无。

表 3 生物素中间精密度结果($n=6$)
Table 3 Biotin intermediate precision results ($n=6$)

编号	生物素含量/($\mu\text{g}/100\text{g}$)								平均值	RSD/%
	0月	1月	2月	3月	6月	8月				
产品 1	46.5	47.2	44.3	48.6	50.2	46.9	47.3	47.3	4.2	
产品 2	16.2	15.8	16.8	17.3	15.9	17.2	16.5	16.5	4.0	
产品 3	28.9	27.5	28.6	29.2	30.1	28.8	28.9	28.9	2.9	
产品 4	65.2	66.8	67.2	64.3	65.8	66.7	66.0	66.0	1.7	
产品 5	99.3	95.6	94.8	96.5	97.2	98.2	96.9	96.9	1.7	
产品 6	55.2	56.2	54.2	57.8	58.4	56.8	56.4	56.4	2.8	

表 4 维生素 B₁₂ 中间精密度结果(*n*=6)
Table 4 Vitamin B₁₂ intermediate precision results (*n*=6)

编号	维生素 B ₁₂ 含量/($\mu\text{g}/100\text{ g}$)				平均值	RSD/%
	0 月	1 月	2 月	3 月		
产品 1	2.82	2.76	2.99	3.01	--	4.3
产品 2	5.62	5.78	5.82	5.52	--	2.5
产品 3	6.82	6.92	6.52	6.68	--	2.6
产品 4	12.2	13.5	11.6	14.2	--	9.3
产品 5	15.6	16.8	14.5	17.2	--	7.7
产品 6	27.5	27.8	30.2	28.6	--	4.3

注: --表示无。

表 5 加标回收率结果(*n*=3)
Table 5 Addition standard recovery test results (*n*=3)

项目加标量/ ng	测得量/ ng			回收率/%	
	1	2	3		
叶酸	2000.0	1980	1991	2045	100.3
	2500.0	2465	2486	2512	99.5
	3000.0	3010	2956	3125	101.0
生物素	800.0	812	780	775	98.6
	1000.0	1002	1056	950	100.3
	1200.0	1228	1158	1260	101.3
维生素 B ₁₂	45.0	42.3	40.6	42.5	92.9
	60.0	56.8	57.8	58.9	96.4
	70.0	64.5	58.9	66.2	90.3

表 6 接种液保存时间
Table 6 Preservation time of inoculation solution

菌种	保存时间/月
鼠李糖乳杆菌	6
植物乳杆菌	8
莱氏曼氏乳杆菌	3

参考文献

- [1] 赵小阳, 李兰, 虞哲高, 等. 液相色谱法测定生物素[J]. 农业质量标准, 2009, (3): 27-29.
- Zhao XY, Li L, Yu ZG, *et al.* Determination of biotin by liquid chromatography [J]. Agric Qual Stand, 2009, (3): 27-29.
- [2] 陆迅, 宋金春. HPLC 测定注射用 13 种复合维生素中生物素、叶酸及 B₁₂ 含量[C]. 湖北省药学会第十一届会员代表大会暨 2007 年学术年会, 武汉, 2007.
- Lu X, Song JC. Determination of biotin, folic acid and B₁₂ in 13 kinds of multivitamins for injection by HPLC [C]. Eleventh Congress of Members of Hubei Pharmaceutical Association and 2007 Annual Academic Conference, Wuhan, 2007.
- [3] 徐硕, 金鹏飞, 邝咏梅, 等. HPLC 法测定复合维生素 B 片中的微量叶酸、维生素 B₁₂ 和生物素[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(6): 1091-1097.
- Xu S, Jin PF, Kuang YM, *et al.* Determination of folic acid, vitamin B₁₂ and biotin in multivitamin B tablets by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(6): 1091-1097.
- [4] 王凤玲, 刘爱国, 孙佳佳, 等. 液相色谱-质谱法同时测定婴幼儿配方奶粉中叶酸、维生素 B₁₂ 和生物素[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 269-272.
- Wang FL, Liu AG, Sun JJ, *et al.* Simultaneous determination of folic acid, vitamin B₁₂ and biotin in infant formula by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Sci, 2013, 34(22): 269-272.
- [5] 刘进玺, 钟红舰, 董小海, 等. 超高效液相色谱-质谱联用测定维生素预混合饲料中生物素含量[J]. 分析实验室, 2010, 29(7): 62-64.
- Liu JX, Zhong HJ, Dong XH, *et al.* Determination of biotin content in vitamin premixed feed by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Ass Lab, 2010, 29(7): 62-64.
- [6] 王任, 吴鸳鸯, 程巧鸳, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定复合维生素片中的叶酸和生物素[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 31(1): 42-46.
- Wang R, Wu YY, Cheng QY, *et al.* Simultaneous determination of folic acid and biotin in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2018, 31(1): 42-46.
- [7] 田浩, 王志伟, 顾文佳, 等. 微生物法测定食品中叶酸、泛酸、生物素、维生素 B₁₂ 注意事项和实践[J]. 中国标准化, 2018, 529(17): 128-131.
- Tian H, Wang ZH, Gu WJ, *et al.* Microbiological method for determination of folic acid, pantothenic acid, biotin and vitamin B₁₂ in food [J]. Chin Stand, 2018, 529(17): 128-131.
- [8] 徐琼, 王志伟, 陈欣钦, 等. 微生物法测定婴幼儿配方乳粉中的生物素、叶酸和维生素 B₁₂[J]. 分析检测, 2014, 37(6): 15-17.
- Xu Q, Wang ZW, Chen XQ, *et al.* Biotin, folic acid and vitamin B₁₂ in infant formula milk powder were determined by microbiological method [J]. Anal Det, 2014, 37(6): 15-17.
- [9] 王旻. 试剂盒法测定乳粉中的维生素[J]. 中国乳品工业, 2012, (3): 57-59.
- Wang M. Determination of vitamins in milk powder by kit method [J]. Chin Dair Ind, 2012, (3): 57-59.
- [10] 黄晓林, 王森, 张丽宏, 等. IFP 微孔板试剂盒检测配方乳粉中维生素 B₁₂ 方法探讨[J]. 中国乳品工业, 2010, (7): 48-49.
- Huang XL, Wang M, Zhang LH, *et al.* Method for determination of vitamin B₁₂ in formula milk powder by IFP microporous plate test box [J]. Chin Dair Ind, 2010, (7): 48-49.
- [11] 王赢, 袁辰刚, 谢小珏, 等. 微孔板式微生物法快速测定婴幼儿奶粉中维生素 B₁₂ 研究[J]. 食品工业, 2015, 36(6): 269-272.
- Wang Y, Yuan CG, Xie XJ, *et al.* Rapid determination of vitamin B₁₂ in infant milk powder by microporous plate microbiological method [J]. Food Ind, 2015, 36 (6): 269-272.
- [12] 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].
- [13] 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].
- [14] GB 5413.14-2010 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 B₁₂ 的测定[S].
- GB 5413.14-2010 National food safety standard-Determination of biotin in food [S].

[15] 董味. 微生物菌种保藏方法[J]. 河北化工, 2009, 23(7): 34-36.

Dong M. Methods of microbial species preservation [J]. Hebei Chem Ind, 2009, 23(7): 34-36.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



黄进丽, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 415752743@qq.com



李 珍, 工程师, 主要研究方向为食品的质量检测。
E-mail: 362178337@qq.com



魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 176019964@qq.com