

生乳细菌总数检测仪测定 生乳细菌总数的应用

富鑫,田雨,管勇佳,房乔,李湘怡,田波*

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室,食品学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:以还原法为理论基础,研制生乳细菌总数检测仪进行生乳细菌总数快速检测,以克服经典还原法目测比色主观性强的缺点,而且检测结果可以定量表示。该仪器连续检测加入试剂后的生乳样品颜色(RGB),通过数理统计分析,采用斜率法以R值斜率表示样品颜色的变化速度。研究以标准平板计数法(SPC法)为标准,建立了R值斜率与菌落总数之间的标准方程,经验证生乳细菌总数检测仪检测结果与SPC法检测结果差异不显著。与流式细胞仪比较,在与SPC法的相关性、运行成本及便携性等方面具有一定优势。

关键词:生乳细菌总数检测仪,还原法,细菌总数,生乳

Application of total bacteria measuring apparatus for detecting total bacteria in raw milk

FU Xin, TIAN Yu, GUAN Yong-jia, FANG Qiao, LI Xiang-yi, TIAN Bo*

(Key Laboratory of Dairy Science of Education Ministry, College of
Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: A total bacteria measuring apparatus was developed for detecting total bacteria in raw milk, which overcame the defects of traditional reduction test measured by eyes, and might make a quantitative expression of total bacteria. The apparatus detected continuously the color (RGB) of the milk samples which had been added reagents, and the rate of color change was showed as R slope by statistical analysis. A standard curve was established to show the relation between R slope and total plate count. There was no significant difference between the two results of total bacteria measuring apparatus and standard plate count method. Comparing with flow cytometry, the total bacteria measuring apparatus had some advantages about better relativity with SPC, lower operating cost and more efficiency.

Key words: total bacteria measuring apparatus; reduction test; total bacteria; raw milk

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)02-0070-05

生乳中的细菌总数通常是指 1 mL 样品在营养琼脂培养基中经 37℃、24 h 培养后所生长的细菌菌落总数。生乳细菌总数是衡量生乳品质的重要指标,对乳制品的生产和质量监控有着重要的指导意义^[1]。检测生乳中细菌总数的方法很多,但在实际生产中,标准平板计数法、流式细胞计数法、美兰法为最广泛应用的方法。但存在的主要缺点为仪器设备昂贵、运行成本高,专业要求高、滞后性严重,检测精度差,无法定量测量^[2-4]。乳品行业属于低

利润、高运行成本的快速消费品行业,因此建立一种测定准确、运行成本低、操作简便的快速检测方法对于乳品行业来说具有巨大的经济价值。本研究利用自主研发的生乳快速检测仪进行实验,试图建立一种快速、准确的新的检测生乳中细菌总数的方法。仪器主要由 LED 发射器、感应器、微处理器等构成,采用 RGB 颜色体系采集信息,记录检测样品颜色变化。本研究以还原法为理论基础,细菌在代谢过程中由于生理需要产生的氧化还原酶,氧化还原酶与刃天青反应使刃天青由蓝色变为紫色、粉色直至无色。根据加入刃天青后生乳的颜色变化可以对细菌总数进行判定,该法与标准平板计数法(SPC法)有很好的相关性($r = -0.79$)^[5]。本研究结合生乳快速检测仪定量分析颜色变化,进行生乳细菌总数的测定。

收稿日期: 2011-02-15 * 通讯联系人

作者简介: 富鑫(1984-),男,硕士研究生,研究方向:食品质量与安全。

基金项目: 东北农业大学科学研究启动基金;“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD04A0814)。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

生乳 采自哈尔滨市幸福乡、成高子、前张家、莫利等地奶户;刃天青 Sigma 公司;营养琼脂 北京奥博星生物技术有限公司。

生乳细菌总数检测仪 可内置 20 个比色皿,测量温度 37℃, CCD 传感器采集样品颜色信息,每 1min 采集一次,连续 10min,传输到计算机,检测结果以样品的三原色值(RGB 值)显示,以 Excel 表格形式存储于计算机中;流式细胞仪 丹麦 Foss 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 RGB 颜色体系的主成分分析 本研究选用 RGB 三原色体系记录颜色变化,于哈尔滨市幸福乡、成高子奶户处随机抽取生乳样品 30 个。取样品 1800μL,加 0.005% (w/v) 刃天青溶液 200μL 于比色杯中混匀,连续记录 10min 内颜色变化信息,对检测结果变量 R 值斜率、G 值斜率、B 值斜率进行主成分分析,选取适当变量表示检测结果。

1.2.2 生乳细菌总数检测仪检测标准曲线的建立与验证 本研究于哈尔滨市幸福乡、成高子奶户处随机取生乳样品 104 个,取样品 1800μL,加 0.005% (w/v) 刃天青溶液 200μL 于比色杯中混匀;将比色杯放入生乳细菌总数检测仪中进行检测,连续 10min 采集样品 RGB 颜色信息,根据 1.2.1 结果以 R 值斜率表示样品颜色的变化速度。以生乳菌落总数为纵坐标,生乳细菌总数检测仪检测结果(R 值斜率)为横坐标,绘制 R 值斜率与菌落总数之间的关系曲线,菌落总数采用标准平板计数法(GB4789-2010)进行测定。应用 Excel 数据分析工具进行回归分析,得到回归方程、相关系数,分析其相关性,绘制标准曲线。另于哈尔滨莫利奶户处随机抽取 34 个生乳样品进行标准曲线的验证,每组做 3 个平行。以 $\bar{X} \pm x$ 形式记录数据,采用 SPSS17.0 统计软件进行相关性分析与 t 检验(双尾)。

1.2.3 与流式细胞计数法比较 流式细胞计数法按照标准操作程序,取生乳样品 100mL,应用 Foss 流式细胞仪进行检测,仪器自动运算并记录样品细菌总数。于哈尔滨市前张家奶户处取生乳样品 41 个,分别采用生乳细菌总数检测仪、Foss 流式细胞仪、标准平板计数法同时进行检测,对检测的结果进行比较实验。

2 结果与分析

2.1 主成分分析结果

应用生乳细菌总数快速检测仪对 30 个生乳样品进行检测,以 R、G、B 值随时间变化的斜率即颜色变化速率 $R = \text{Slope}(R \text{ 值变化量/时间})$ $G = \text{Slope}(G \text{ 值变化量/时间})$ $B = \text{Slope}(B \text{ 值变化量/时间})$ 作为变量,分别记为“R 值斜率”、“G 值斜率”、“B 值斜率”。结果如表 1 所示。

应用统计软件 SPSS statistics1.7 对表 1 中数据进行因子分析,抽取方法为主成分分析(principal component analysis),结果如表 2 所示。

表 1 刃天青还原法 RGB 检测值

Table 1 The result of reduction test in R、G、B

样品号	R 值 斜率	G 值 斜率	B 值 斜率	样品号	R 值 斜率	G 值 斜率	B 值 斜率
1	30.88	-7.27	-3.73	16	137.03	-23.39	-23.12
2	40.09	-6.70	-5.91	17	149.82	-41.00	-29.76
3	44.58	-11.42	-9.73	18	160.24	-34.09	-29.97
4	54.45	-13.61	-6.00	19	162.88	-33.82	-27.18
5	66.09	-34.94	-18.36	20	168.39	-33.09	-31.64
6	71.55	-23.58	-14.85	21	185.73	-28.33	-27.45
7	74.52	-19.64	-14.88	22	190.42	-21.45	-29.24
8	77.67	-18.73	-21.06	23	193.70	-23.39	-37.12
9	78.88	-23.15	-17.15	24	203.82	-54.15	-41.09
10	79.52	-16.67	-13.12	25	214.30	-30.24	-24.88
11	81.06	-24.91	-21.12	26	251.12	-24.30	-27.42
12	85.91	-18.82	-14.88	27	265.76	-43.52	-42.18
13	97.12	-27.55	-21.12	28	283.42	-21.79	-21.91
14	115.18	-20.97	-26.48	29	313.09	-44.45	-44.79
15	129.58	-22.61	-20.97	30	353.12	-41.88	-45.48

表 2 主成分分析-总体方差解释

Table 2 Principal components-Total Variance Explained

成分	初始特征值			主成分载荷		
	合计	方差所占 比例(%)	累计 (%)	合计	方差所占 比例(%)	累计 (%)
1	2.58	86.15	86.15	2.58	86.15	86.15
2	0.34	11.17	97.33			
3	0.08	2.67	100.00			

由表 1 可以看出,不同细菌总数样品的检测结果,R 值斜率变化幅度最大,G、B 值斜率变化幅度较小。由表 2 可以看出成分 1(R 值斜率)特征值为 2.58 > 1,占总方差(即贡献率)86.15% > 85%。由表 3 可以看出 R 值与所代表变量(颜色变化)的相关系数为-0.905,即 R 值对所表示变量有很强的代表性,可对所表示变量进行充分解释。由以上分析得出,本研究在生乳细菌总数快速检测仪的使用中,可采用主成分变量 R 值斜率表示样品颜色变化程度。

表 3 因子载荷矩阵

Table 3 Component loading matrix

项目	相关系数
R 值	-0.905
G 值	0.904
B 值	0.974

2.2 生乳细菌总数快速检测仪标准曲线的建立

应用生乳细菌总数检测仪对 104 个生乳样品进行检测,同时通过标准平板计数法进行菌落计数。以生乳细菌菌落总数为纵坐标,生乳细菌总数检测仪检测结果(R 值斜率)为横坐标,绘制 R 值斜率与菌落总数之间的关系曲线,结果如图 1 所示。

得到回归方程: $y = 1.230x - 5.215 (R^2 = 0.880)$,式中 y 为生乳菌落总数,x 为 R 值斜率。经 F 检验 $F = 752.165 > F_{0.05}(1.102) = 3.93$,即生乳细菌总数检测仪检测结果与标准平板计数法检测结果相关关系极显著。本研究以此方程作为标准方程,后续的测定中将生乳细菌总数检测仪测定结果的 R 值斜率代入此方程,得到生乳细菌总数。

2.3 验证实验结果

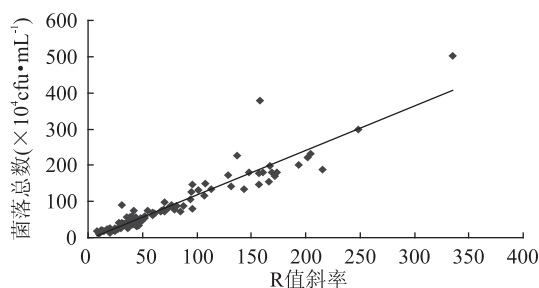


图1 R 值斜率与菌落总数的关系曲线

Fig.1 Relation between R slope and total plate count

为了验证标准曲线建立的合理性,采集生乳样品 34 个,应用生乳细菌总数检测仪进行检测,计算 R 值斜率,根据回归方程计算出样品中的细菌总数,与 SPC 法比较,结果如表 4 所示。

表 4 SPC 法与生乳细菌总数检测仪的检测结果

Table 4 Results of SPC and total bacteria measuring apparatus

SPC 法 ($\times 10^4$ cfu $\cdot \text{mL}^{-1}$)	生乳细菌 总数检测仪 ($\times 10^4$ cfu $\cdot \text{mL}^{-1}$)	SPC 法 ($\times 10^4$ cfu $\cdot \text{mL}^{-1}$)	生乳细菌 总数检测仪 ($\times 10^4$ cfu $\cdot \text{mL}^{-1}$)
7.8 ± 1.4	10.7 ± 1.2	67.0 ± 10.9	69.2 ± 4.3
16.6 ± 1.2	14.8 ± 2.6	71.0 ± 6.2	74.2 ± 5.2
27.9 ± 3.3	33.4 ± 2.1	71.3 ± 8.8	72.4 ± 5.8
28.1 ± 2.5	31.0 ± 1.5	71.4 ± 4.2	72.0 ± 2.1
31.3 ± 2.6	33.5 ± 6.7	78.0 ± 11.0	78.0 ± 2.1
34.1 ± 2.5	31.0 ± 1.5	81.0 ± 27.6	83.2 ± 5.5
35.0 ± 0.7	37.6 ± 3.3	91.2 ± 8.2	90.0 ± 8.8
37.9 ± 3.3	38.4 ± 2.1	98.9 ± 8.4	100.2 ± 8.8
35.0 ± 0.7	37.6 ± 3.3	101.3 ± 8.8	122.4 ± 5.8
37.9 ± 3.3	38.4 ± 2.1	108.0 ± 6.2	134.2 ± 5.2
41.1 ± 2.5	41.0 ± 1.5	110.3 ± 8.8	122.4 ± 5.8
44.4 ± 2.5	46.3 ± 2.5	131.3 ± 4.2	132.0 ± 2.1
48.3 ± 2.6	53.5 ± 6.7	158.0 ± 11.0	152.0 ± 2.1
50.1 ± 2.5	55.2 ± 2.5	160.0 ± 27.6	163.2 ± 5.5
53.3 ± 2.6	55.5 ± 6.7	177.4 ± 25.0	180.3 ± 2.6
58.0 ± 0.7	60.6 ± 3.3	192.3 ± 20.0	187.0 ± 3.5
61.2 ± 2.5	63.2 ± 1.5	226.0 ± 27.6	213.2 ± 5.5

将表 4 中 SPC 法与生乳细菌总数检测仪测定结果进行 t-检验,结果如表 5 所示。

表 5 t-检验结果

Table 5 Result of t-test

检验	P(T ≤ t) 双尾	t(双尾临界)
1.371	0.164	3.4579

由表 5 t-检验结果可知, $t_{\text{Stat}} < t$ (双尾临界),说明应用生乳细菌总数检测仪制作的标准曲线计算的细菌总数与 SPC 法检测结果差异不显著,并具有良好的相关性,所以证明本研究制作标准曲线较准确。

2.4 与流式细胞计数法比较

取生乳样品 41 个,分别采用生乳细菌总数检测仪、Foss 流式细胞仪进行检测,结果如图 2 所示。

生乳细菌总数检测仪检测结果与流式细胞仪检测结果经回归分析,得相关系数 $r = 0.8970$,表明两种方法具有良好的相关性。生乳细菌总数检测仪与标准平板技术法检测结果经回归分析,得相关系数

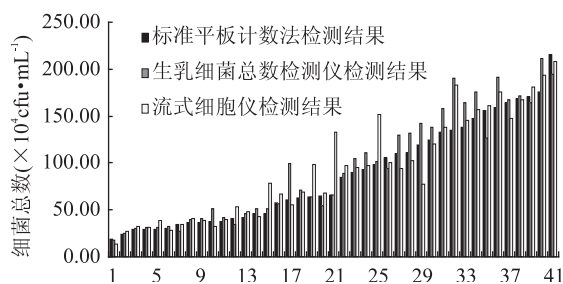


图2 生乳细菌总数检测仪与 Foss 流式细胞仪结果比较

Fig.2 Results of total bacteria measuring apparatus and

Foss flow cytometry

$r = 0.9268$ 。流式细胞仪计数法与标准平板计数法检测结果经回归分析,得相关系数 $r = 0.8853$ 。结果表明,生乳细菌总数检测仪较流式细胞仪与标准平板计数法有更为良好的相关性。

3 讨论

3.1 本课题组采用自主研制的生乳细菌总数检测仪,分析加入试剂后生乳的颜色变化,通过因子分析确定由变量 R 值斜率表示样品中的细菌总数引起的颜色变化,建立了标准方程,实际测定中只需将生乳细菌总数检测仪测定结果的 R 值斜率代入此方程,即可得到生乳的细菌总数。

3.2 由于奶牛品种、饲养条件、环境卫生等因素,污染生乳的细菌来源复杂^[6],细菌之间的关联性低^[7],所以不同生乳样品菌相不尽相同导致还原酶含量、活力的差异^[8],引起刃天青还原速度的差异,进而影响 R 值斜率,影响最终的检测结果。

3.3 在与流式细胞计数法的比较中可以看出,生乳细菌总数检测仪与流式细胞仪两种方法具有良好的相关性。但是当细菌总数较高时,生乳细菌总数检测仪的测定结果略低于流式细胞仪测定结果,存在一定误差,原因在于标准平板计数法是对活细胞进行计数,而流式细胞仪是对总体细胞进行计数,包括了活细胞和死细胞^[9]。与流式细胞仪比较,生乳细菌总数检测仪的检测方法与标准平板计数法之间的相关系数更高,检测成本低于 0.05 元,是流式细胞仪检测成本的百分之一,检测所用时间短、更为便携。综合比较,生乳细菌总数检测仪较流式细胞仪具有一定优势。

3.4 随着乳品行业产业升级与产业链的不断完善,乳业对生乳的“质”与“量”的要求不断增加。高质量生乳对乳业运行成本的影响日渐明显。便捷、快速、较低的检测成本是未来生乳微生物指标检测技术的发展方向。本研究应用生乳细菌总数快速检测仪建立的检测方法,较标准平板计数法更为快速;较流式细胞计数法更为经济、便捷;较美兰法更为准确,可以使生乳质量在第一时间受到严格控制,最终达到节约运营成本,提高产品品质的目的。

4 结论

本实验根据还原法原理研究了生乳细菌总数检测仪对生乳细菌总数的定量分析,以 R 值斜率标志颜色变化,建立了新的检测方法。该法操作简单、检

(下转第 88 页)

表6 桑叶绿茶七次冲泡后各种元素浸出的总量及相对浸出率

Table 6 The total extracting content and relative extracting rate of each trace element after brewing seven times in mulberry green tea

元素	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
元素总量(μg/g)	14810.2	1771.3	428.6	105.5	20.31	71.84
七次冲泡总浸出量(μg/g)	425.2	721.05	21.03	6.55	5.81	24.31
相对浸出率(%)	2.87	40.71	4.91	6.21	28.61	33.59

说明这三种元素在桑叶绿茶中与其他基团结合后水溶性差,因此在以后开发桑叶绿茶及相关产品时值得进行更深入的研究。

2.5 精密度和回收率实验

准确称取 1.0000g 桑叶绿茶样品,经处理后取 10 份平行,其中五份加入定量的标准溶液进行加标回收率实验,另五份直接用超纯水定容,测定各种元素的回收率和精密度,以结果的 RSD 值表示精密度,测定结果见表 7。

表7 RSD 值和回收率实验结果

Table 7 The relative standard deviation and recovery test results

元素	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
相对标准偏差(%)	0.09	0.13	1.56	1.05	1.65	1.36
回收率(%)	98.5	102.3	108.1	104.4	108.9	106.3

3 结论

桑叶绿茶中微量元素 Ca、Mg、Fe、Mn、Cu、Zn 含量比较丰富,总含量高低依次为 $Ca > Mg > Fe > Mn > Zn > Cu$,其中 Ca 和 Fe 的含量是碧螺春和西湖龙井两种绿茶的 3 倍,Zn 含量是其 2 倍。因此,桑叶绿茶是补充人体 Ca、Mg、Fe、Zn 元素的优良植物来源。

桑叶绿茶中 6 种元素浸出量依次为 $Mg > Ca > Zn > Fe > Mn > Cu$,Mg 最易浸出,Cu 最不易浸出,随着浸泡时间的延长,Ca、Mg 浸出量增加较快,其次为 Zn 和 Fe,浸出速率增加最慢为 Cu。在研究桑叶绿茶微量元素浸出规律时发现,随着冲泡时间的延长,六种微量元素的浸出量与时间之间可用对数关系描述,而不同冲泡次数与六种元素浸出量之间则可用负指数关系描述。

(上接第 72 页)

测速度快、单个样品检测成本低、检测结果与标准平板计数法及流式细胞计数法有较好的相关性,是一种值得推广的新的生乳细菌总数快速检测方法,适用于实际生产中对生乳质量的控制。

参考文献

- [1] 方义仁.原料奶质量对 UHT 奶制品的影响及控制[J].中国乳品工业,1998,26(1):34-34.
- [2] 吕元,尹源明,等.原料奶嗜冷菌快速检测方法研究进展[J].食品科学,2009,30(3):274-278.
- [3] 田波,霍贵成,籍婷.乳与乳制品中细菌总数的检测技术[J].中国乳品工业,2004,32(2):27-31.
- [4] T S Gunasekera, P V Attfield, DA Veal. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk[J].Applied and Environmental Microbiology,2000,66(2):1228-1232.

参考文献

- [1] 张明德.桑叶临证举隅[J].时珍国医国药,1999,10(4):281.
- [2] 王储炎,范涛,代君君.桑叶的化学成分、生理功能及其在工业中的应用[J].中国食品添加剂,2008(2):148-151.
- [3] 欧阳臻,陈钧.桑叶的化学成分及其药理作用研究进展[J].江苏大学学报:自然科学版,2003,24(6):39-45.
- [4] 王芳,励建荣.桑叶的化学成分、生理功能及应用研究进展[J].食品科学,2005,26(增刊):111-117.
- [5] 王在贵,朱保建,储海娟,等.不同叶龄桑叶中微量元素含量分析[J].安徽农业大学学报,2010,37(1):154-157.
- [6] 刘旭辉,覃勇荣,秦彩霞,等.火焰原子吸收光谱法测定宜州桑叶中的微量元素[J].光谱实验室,2009,26(5):1349-1355.
- [7] 马稳,袁红霞,马文芝.火焰原子吸收法测定夏枯草、桑叶、野菊花中十种微量元素[J].光谱实验室,2004,21(4):745-747.
- [8] 邹盛勤.桑叶中微量元素的测定分析[J].广东微量元素科学,2004,11(1):44-46.
- [9] 范文秀,侯玉霞,朱芳坤.金银花茶中微量元素的溶出特性研究[J].食品工业科技,2008,29(10):59-61.
- [10] 张忠诚,徐祗云,张素洁.镁与人体健康[J].微量元素与健康研究,2006,23(4):67-69.
- [11] 邹盛勤,罗小凤.茶叶中微量元素溶出率及保健作用研究进展[J].微量元素与健康研究,2005,22(5):57-59.
- [12] 王宝森,许春,张虹,等.云南云雾茶微量元素含量及其浸出率研究[J].江苏农业科学,2007(4):190-193.
- [13] 范学森,张迎新,王彩兰,等.仓颉菊的微量元素含量与功用[J].微量元素与健康研究,1999,16(1):52-53.
- [14] 王小平,江伟威.红茶与绿茶中微量元素溶出率的比较研究[J].苏州大学学报:医学版,2002,22(5):523-525.

- [5] A R Garcia, M Prieto, A Otero, et al. Assessment of the microbiological quality of raw ewes milk by rapid colorimetric methods [J].Netherlands Milk and Dairy Journal,1994,48(2):99-110.
- [6] A M Elmoslemany, G P Keefe, B M Jayarao. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince EdwardIsland dairy herds.Part 2: Bacteria count-specific risk factors [J].Dairy Science,2009,92:2644-2652.
- [7] B M Jayarao, S R Pillai, A A Sawant.Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cellcount and bacterial counts [J].Dairy Sci,2004,87:3561-3573.
- [8] 武汉大学生物系微生物学教研室译.微生物学[M].北京:科学出版社,1987:711-712.
- [9] Holmc, Mathiasent. A flow cytometrictechnique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tankmilk[J].Journal of Applied Microbiology,2004,97(5):935-941.