

乳制品中活双歧杆菌检测试剂盒的研制及应用*

张林芳, 孟祥晨

(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 在 EMA Real-Time PCR 检测方法的基础上, 组装检测乳制品中活双歧杆菌的荧光定量 PCR 试剂盒。建立了 EMA Real-Time PCR 检测乳制品中活双歧杆菌的标准曲线。组装出检测乳制品中活双歧杆菌的荧光定量 PCR 试剂盒。该试剂盒批内及批间变异系数(CV)均小于 5%; 对乳制品中常见乳酸菌无交叉反应; 最低检测限为 2×10^4 CFU/mL。该试剂盒在 -20°C 下, 至少可保存 6 个月, 4°C 可保存 3 个月。分别采用研究所获得的试剂盒和平板菌落计数法检测 12 份市售酸乳中的活双歧杆菌的数量, 2 种检测方法计数结果差异不显著 ($P > 0.05$)。该方法所建立的标准曲线相关系数大于 98%。所研制的试剂盒重复性较好、特异性较强、灵敏度较高, 可以准确地定量检测乳制品中的活双歧杆菌。

关键词 双歧杆菌, 实时 PCR, 试剂盒

双歧杆菌是人类及动物肠道中对机体有益的微生物, 与机体健康状况密切相关, 因而被广泛开发应用于医疗、保健、食品等方面。只有当双歧杆菌活菌数达到 10^6 CFU/mL 以上时, 才能发挥正常的生理功能^[1], 因此双歧杆菌的活菌数量影响或决定产品的品质。目前, 检测双歧杆菌活菌数的技术主要分为 2 大类, 一类是以传统平板菌落计数为基础的检测技术, 另一类是以分子生物学为基础的各种检测技术。由于双歧杆菌严格厌氧, 因此传统的平板菌落技术方法需要特殊的设备, 而且过程比较繁琐; 而采用酶联免疫吸附试验 (ELISA), F6PPK 酶检测技术, 免疫印迹法 (immuno-blotting), PCR 技术等方法检测双歧杆菌的特异性较低^[2-5]。实时 PCR (Real-Time PCR) 技术具有高特异性、高灵敏性、检测时间短、无污染等优点, 在分子生物学各相关领域, 如医学、检验检疫、军事、农业、基础研究领域得到广泛的应用^[6], 也逐渐应用在双歧杆菌的检测上^[7-10]。但是 Real-Time PCR 技术不能区分死菌、活菌和休眠菌, 这样会给双歧杆菌的活菌计数带来困难。溴化乙锭叠氮化物 (ethidium bromide monoazide, EMA) 是一种荧光核酸染料, 它可以与死菌体的 DNA 结合形成共价化合物, 进而能抑制死菌体的 DNA 进行 PCR 扩增^[11]。将 EMA 和分子信标探针融合到 Real-Time PCR 检测技术中不但可以只检测活菌, 同时还可以增加检测的灵敏度, 缩短检测时间。基于上述理念, 研究小组成功

开发了 EMA-Real-Time PCR 技术用以检测乳制品中活双歧杆菌的数量^[12], 通过与平板菌落技术方法比较发现, 应用我们开发的方法所获得的结果与平板菌落技术方法获得的结果无显著性差异, 还同时具有快速、特异等优点。本研究的目的是在前所开发技术的基础上, 组装试剂盒, 并将所组装的试剂盒应用于市售酸奶中活双歧杆菌的检测。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌株: 长双歧杆菌标准株 (*Bifidobacterium longum*) ATCC15707, 购于中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC); 试验用双歧杆菌菌株及其它参考菌株由 KLDS 乳品工业微生物菌种保藏中心 (KLDS-DICC) 提供, 见表 1。

表 1 试验用菌株的名称及来源

菌种	菌株编号	来源
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	KLDS2. 0506	KLDS-DICC
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KLDS2. 0503	KLDS-DICC
<i>Bifidobacterium longum</i>	KLDS2. 0504	KLDS-DICC
<i>Bifidobacterium infantis</i>	KLDS2. 0505	KLDS-DICC
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	KLDS1. 0204	KLDS-DICC
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KLDS1. 0327	KLDS-DICC
<i>Lactobacillus casei</i>	KLDS1. 0338	KLDS-DICC
<i>Streptococcus thermophilus</i>	KLDS3. 0201	KLDS-DICC

主要试剂: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN), Taq DNA 聚合酶和 dNTPs (TIANGEN), 溴化乙锭叠氮化物 (美国 Sigma 公司产品)。

培养基: TPY 培养基^[13], 改良 MRS 培养基^[14]。

仪器: ABI 7500 实时荧光 PCR 仪 (Applied Bio-

第一作者: 硕士研究生 (孟祥晨教授为通讯作者)。

* 黑龙江省自然科学基金重点项目资助 (ZJN03-3)

收稿日期: 2009-02-23, 改回日期: 2009-04-09

system), 厌氧培养箱(自行设计制造), SPX-150B 生化培养箱(上海佳胜实验设备有限公司), BCN1360 型生物洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造)。

1.2 引物和探针

本试验所用引物和分子信标探针^[15]均由上海 Invitrogen 公司合成。

上游引物: 5'-TCTGGCTCAGGATGAACGC-3'

下游引物: 5'-CACCGTTACACCGGGAATTC-3'

分子信标探针: 5'-FAM-CCAGGCATCCGGCAT-TACCACCCGCTCTGG-3'-DABCYL

1.3 试验方法

1.3.1 采用 EMA 对含双歧杆菌乳制品的处理

取 1 mL (1 g) 含双歧杆菌的乳制品, 加入 1 μ L EMA 进行处理, 然后用卤素灯照射 5 min。

1.3.2 含双歧杆菌乳制品中细菌基因组 DNA 的提取

本研究采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 提取 DNA, 具体操作方法参考试剂盒说明书。

1.3.3 反应体系

本试验选用 50 μ L 反应体系: 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 4 μ L, 分子信标探针 (5 μ mol/L) 4 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 4 μ L, 10 \times PCR Buffer (不含 Mg^{2+}) 5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 8.0 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, ROX 基准染料 2 μ L, DNA 模板 5 μ L。

扩增反应程序为: 94 $^{\circ}$ C \times 3 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C \times 1 min \rightarrow 40 $^{\circ}$ C \times 35 s \rightarrow 59 $^{\circ}$ C \times 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C \times 1 min, 40 个循环。(注: 有下划线的步骤表示在此温度下采集荧光信号)

1.3.4 EMA Real-Time PCR 检测乳制品中活双歧杆菌标准曲线的建立

采用 1.3.2 方法提取已知 *B. longum* ATCC15707 含量为 10⁹ CFU/mL 的乳制品样品中的细菌基因组 DNA, 用无菌超纯水对 DNA 进行 10 倍递增梯度稀释, 选取第 1 - 5 个稀释度 (所对应的 *B. longum* ATCC15707 的含量为 10⁸ - 10⁴ CFU/mL) 的 DNA 作为荧光定量 PCR 的模板, 以不同菌数对数值 (Log10 CFU/mL) 为横坐标, 以荧光定量 PCR 反应过程中出现荧光信号的初始循环数 (Ct) 为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.3.5 EMA Real-Time PCR 检测试剂盒的组装

为减少反应液使用量, 使该检测方法应用时更加

方便、快捷, 本试验按试剂成分的不同进行了反应物质的组装。共 3 个方案: 方案 1 为引物、探针、酶与其他缓冲液组装在一起; 方案 2 为引物、探针与其他缓冲液组装在一起, 酶单独存放; 方案 3 为探针、酶与其他缓冲液组装在一起, 引物单独存放。分别采用在 -20 $^{\circ}$ C 储存 24 h、48 h 后的混装反应液, 对 *B. longum* ATCC15707 DNA, 进行 Real-Time PCR 扩增, 然后按照 1.3.4 所建立的标准曲线计算其中长双歧杆菌的含量, 同时采用未混装的反应液以及平板菌落总数计数 (GB/T 4789.34 - 2003) 方法计数长双歧杆菌, 比较 3 种试剂盒组装方法所获得的结果与 2 种对照方法获得结果的显著性。

1.3.6 含双歧杆菌乳制品样品的制备

(1) 含双歧杆菌乳粉溶液的制备: 在无菌条件下称取普通全脂奶粉 10 g, 加入 100 mL 灭菌的蒸馏水, 使奶粉充分溶解后, 加入 6 000 r/min 条件下离心 10 min 收集的双歧杆菌菌体, 混合均匀, 制得含双歧杆菌的奶粉溶液, 备用。

(2) 含双歧杆菌酸乳的制备: 准确称量全脂乳粉 16 g, 蔗糖 1 g, 加入 100 mL 蒸馏水, 充分溶解, 90 $^{\circ}$ C 杀菌 30 min, 冷却至 45 $^{\circ}$ C, 在无菌室内加入 0.003 g 丹尼斯克罗地亚直投式酸奶发酵剂 (MH-01) 和离心后的双歧杆菌菌体, 充分溶解混合后, 置于 42 - 43 $^{\circ}$ C 保温发酵, 当 pH 达到 4.6 时取出, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜, 制得含双歧杆菌的酸乳, 备用。

1.3.7 试剂盒的方法学评价

根据 1.3.5 试验所确立的试剂盒混装方案, 用混装后在 -20 $^{\circ}$ C 条件下保存 1 个月的试剂盒, 检测 1.3.6 试验制备的乳制品样品, 从而确定该试剂盒的特异性、灵敏度和重复性。

1.3.7.1 特异性检验

按照 1.3.6 试验方法, 分别制备单独含有 *B. longum* ATCC15707、*B. adolescentis*、*B. bifidum*、*B. longum*、*B. infantis* 的乳粉溶液和自制酸乳共 10 种, 单独含 *Lb. bulgaricus*、*Lb. acidophilus*、*Lb. casei*、*S. thermophilus* 的乳粉溶液和自制酸乳共 8 种, 采用所确定的试剂盒对以上乳制品进行检测。同时以去离子水做空白对照, 进行实时 PCR 扩增, 通过检测各个反应中 FAM 荧光基团有无指数期增长变化来研究本试验确定的试剂盒的特异性。

1.3.7.2 灵敏度检验

以已知 *B. longum* ATCC15707 含量 (10⁸ CFU/mL) 的乳粉溶液和自制酸乳中双歧杆菌 DNA 为阳性

模板,该阳性模板经连续稀释后用试剂盒进行 EMA Real-Time PCR 检测,同时以去离子水做空白对照。通过比较扩增曲线及 Ct 值,确定试剂盒的最低检测限。

1.3.7.3 重复性检验

重复性检验包括批内和批间重复性检验。用同一批次组装的 3 个试剂盒和不同批次组装的 3 个试剂盒,对同一个经 EMA 处理后的奶粉溶液和自制酸奶中 *B. longum* ATCC15707 的 DNA 进行 EMA Real-Time PCR 反应,每个试验均作 3 个重复,计算批内和批间 Ct 值的变异系数。

1.3.8 试剂盒的保存试验

将试剂盒分别保存于 -20℃ 和 4℃ 冰箱,在保存后半年内的每个月,分别用保存的试剂盒和未混装的反应液,检测 37℃ 厌氧培养 16h 的 *B. longum* ATCC15707 菌液中的活双歧杆菌的数量,同时用平板菌落计数 (GB/T 4789.34 - 2003) 方法计数 *B. longum* ATCC15707 中的活双歧杆菌的数量,比较 2 种方法所获得结果的显著性。

1.3.9 试剂盒在市售酸乳双歧杆菌检测中的初步应用

购自家乐福超市的 3 个品牌共计 12 种含有双歧杆菌的酸乳依次编号为 1-12。将上述市售酸乳按 1.3.1 的方法用 EMA 进行处理,然后采用 1.3.2 的方法提取细菌基因组 DNA,接着用 1.3.5 方法确定的试剂盒进行 Real-Time PCR 扩增,根据扩增所得的结果按照 1.3.4 方法所建立的标准曲线计算酸奶中活双歧杆菌的含量。同时将市售酸乳进行系列梯度稀释,选取适宜稀释梯度涂布于改良 MRS 平板,

将 MRS 平板倒置于厌氧箱在 37℃ 下培养 48 h 后,计数酸乳中的活双歧杆菌数量。比较上述 2 种方法所获得的计数结果。

2 结果与讨论

2.1 EMA Real-Time PCR 检测乳制品中活双歧杆菌标准曲线的建立

EMA Real-Time PCR 检测纯培养液中活双歧杆菌的标准曲线方程为: $Y = -3.96X + 47.66$, 相关系数 R^2 值 > 0.98 , 双歧杆菌培养液的浓度位于 $10^4 - 10^8$ CFU/mL 具有良好的线性关系 (图 1)。方程中, X 代表双歧杆菌活菌数的对数值 (LogCFU/mL), Y 代表 Real-Time PCR 的初始循环数 (Ct), 通过将测得的 Ct 值 (Y) 代入方程求出 X , 再求其反对数, 可以计算出待测样品中的双歧杆菌的活菌数。

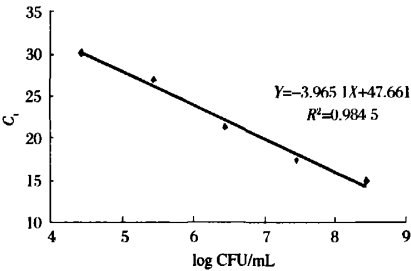


图 1 EMA Real-Time PCR 检测乳制品中活双歧杆菌时 LogCFU/mL- Ct 间的线性关系

2.2 EMA Real-Time PCR 检测试剂盒的组装

按照 1.3.4 的试验方法分别采用 3 种不同方法组装试剂盒,所组装的试剂盒在 -20℃ 贮存 24 h 和 48 h 后,对 *B. longum* ATCC15707 DNA 进行 Real-Time PCR 扩增,所获得的结果见表 2。

表 2 由不同组装方案获得的试剂盒在 -20℃ 贮存 24 h 和 48 h 后对 *B. longum* ATCC15707 DNA 的检测结果 (Log CFU/mL ± SD)

在 -20℃ 贮存 24 h 的试剂盒			对 照	
方案 1	方案 2	方案 3	未混装体系	平板菌落计数
8.41 ± 0.76 a	8.43 ± 0.23 a	8.47 ± 0.37 a	8.43 ± 0.13 a	8.45 ± 0.23 a
在 -20℃ 贮存 48 h 的试剂盒			对 照	
方案 1	方案 2	方案 3	未混装体系	平板菌落计数
7.87 ± 0.72 b	8.70 ± 0.19 a	8.42 ± 0.49 b	8.69 ± 0.06 a	8.67 ± 0.16 a

注:同行数据角标不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

由表 2 可见,使用在 -20℃ 贮存 24 h 后的试剂盒进行检测时,由 3 个方案获得的结果与 2 对照结果无显著差异;使用在 -20℃ 贮存 48 h 后的试剂盒进行检测时,根据方案 1 和方案 3 组装的试剂盒所获得

的结果与 2 对照结果差异显著 ($P < 0.05$),而根据方案二进行组装所获得的结果与 2 对照间无显著差异 ($P > 0.05$),因此选择方案 2 作为试剂盒的组装方法。

2.3 试剂盒的方法学评价

2.3.1 特异性检验

使用方案2组装的试剂盒,对上述目的菌株与阴性对照的细菌基因组DNA进行Real-Time PCR扩增。图2显示的是乳粉溶液中不同菌株的Real-Time PCR扩增曲线,图3显示的是酸乳中不同菌株的Real-Time PCR扩增曲线。由图2和图3可知,含目的菌株双歧杆菌的乳粉溶液和酸乳,其扩增曲线均呈现明显的S型;而阴性对照(含4种乳酸菌的乳粉溶液和酸乳)均未检测到荧光信号。上述结果表明,本研究所研制的试剂盒特异性较强。

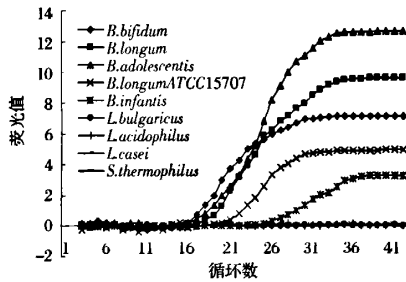


图2 乳粉溶液中不同菌株的Real-Time PCR扩增曲线

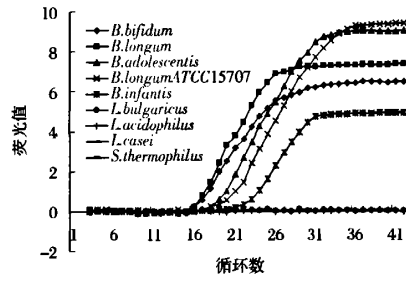


图3 酸乳中不同菌株的Real-Time PCR扩增曲线

2.3.2 灵敏度检验

当乳粉溶液和自制酸乳中的*B. longum* ATCC15707含量在 $10^8 - 10^3$ CFU/mL时,均能检测到荧光信号和Ct值,但*B. longum* ATCC15707含量为 10^3 CFU/mL时,虽仍能检测出荧光信号和Ct值,但扩增曲线已不明显,重复实验偶尔无法检出(图4和图5)。因此,采用本研究所研制的试剂盒检测乳制品中活双歧杆菌的检出限为 10^4 CFU/mL。

2.3.3 重复性检验

含*B. longum* ATCC15707的奶粉溶液和酸奶,分别采用同一批次组装的3个试剂盒和不同批次组装的3个试剂盒进行Real-Time PCR扩增,根据获得的Ct值计算批内和批间重复性。奶粉溶液和自制酸奶批内重复性的CV值分别为1.20%和0.55%;批间重

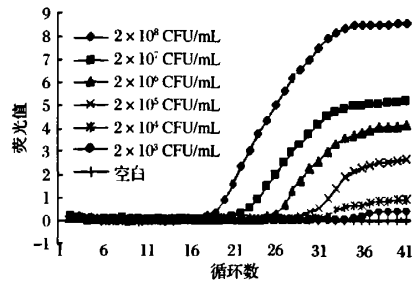


图4 乳粉溶液中不同浓度的*B. longum* ATCC15707的扩增

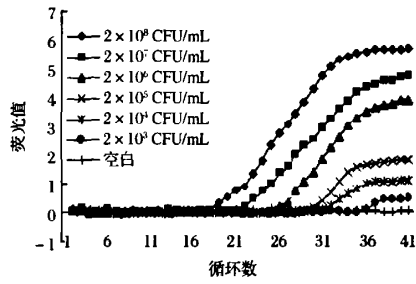


图5 酸乳中不同浓度的*B. longum* ATCC15707的扩增

复性的CV值分别为1.44%和0.57%。以上结果表明,该试剂盒批内和批间重复的CV值均在5%以内,具有较好的重复性。

2.4 试剂盒保存期检验

采用本研究所研制的、在4℃条件下保存3个月以内的试剂盒,对*B. longum* ATCC15707 DNA进行检测,获得的结果与未混装体系和平板菌落计数所获得的结果无显著性差异($P > 0.05$)(表3);当在4℃条件下保存3个月以上时,所获得的结果与两对照获得的结果差异显著($P < 0.05$)(表3)。采用在-20℃保存6个月以内的该试剂盒,获得的结果与两对照间所获得的结果差异均不显著($P > 0.05$)(表3)。

表3 在4℃和-20℃保存6个月的试剂盒对*B. longum* ATCC15707菌液中活双歧杆菌的检测结果 (Log CFU/mL ± SD)

保存时间 /月	试剂盒		对照	
	保存温度		未混装体系	平板菌落计数
	4℃	-20℃		
1	8.22 ± 0.76a	8.18 ± 0.05a	8.19 ± 0.37a	8.22 ± 0.01a
2	8.21 ± 0.04a	8.28 ± 0.04a	8.29 ± 0.22a	8.35 ± 0.02a
3	8.06 ± 0.04a	8.04 ± 0.06a	8.08 ± 0.36a	8.06 ± 0.03a
4	8.02 ± 0.12b	8.26 ± 0.02a	8.28 ± 0.08a	8.25 ± 0.11a
5	8.18 ± 0.09b	8.33 ± 0.11a	8.35 ± 0.20a	8.34 ± 0.10a
6	8.01 ± 0.23b	8.27 ± 0.02a	8.26 ± 0.48a	8.24 ± 0.11a

注:同行数据角标不同表示差异显著($P < 0.05$)。

上述结果表明,所研制的试剂盒在4℃条件下至少可保存3个月,在-20℃条件下至少可保存6个月,试剂盒稳定性良好。

2.5 试剂盒对市售酸乳中活双歧杆菌的检测

采用在-20℃条件下保存1个月的试剂盒,对市售的12种含双歧杆菌酸乳中的活双歧杆菌进行定量检测,同时采用平板菌落计数方法计数,2种检测计数方法所获得的结果无显著性差异($P>0.05$),采用本研究所组装的试剂盒进行检测,只需要5h即可完成,平板菌落技术方法约需要48h左右。

3 结论

本研究在前期建立的EMA-Real-Time PCR检测乳制品中活双歧杆菌技术的基础上组装了试剂盒。建立了检测乳制品中活双歧杆菌的标准曲线,线性方程为: $Y = -3.96X + 47.66$,相关系数大于98%。该试剂盒重复性较好,特异性较强,对乳制品中活双歧杆菌的检出限为 2×10^4 CFU/mL。该试剂盒在4℃条件下可保存3个月,在-20℃下可至少保存6个月。应用试验结果表明,该试剂盒的检测方法与平板菌落计数结果差异不显著($P>0.05$),检测时间为5h,可作为乳制品中活双歧杆菌的快速检测方法。

本研究所研制的检测乳制品中活双歧杆菌的检测试剂盒虽然具有快速、灵敏、特异、不易污染、准确定量等优点,但是也存在着一些不足之处。首先是分子信标探针所含的荧光素标记见光极易分解,需避光保存;EMA溶液见光易分解,且有致癌作用,操作时需小心。其次是由于试验条件,本试剂盒只是在ABI公司研制的7500实时PCR扩增仪进行了应用,其它仪器是否有影响还有待进一步确定。

参 考 文 献

- [1] 康白. 双歧杆菌[M]. 大连:大连海事大学出版社, 1998. 68-69.
- [2] 袁耀武, 张伟, 田洪涛, 等. 乳制品中双歧杆菌的快速检测[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(6): 104-107.
- [3] Eva V, Nevoralb J, Jencikovac B, et al. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 60(3): 365-373.
- [4] Duez H, Pelletier C, Cools S, et al. A colony immunoblotting method for quantitative detection of a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain in human faeces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 88(6): 1 019-1 027.
- [5] Matsuki T, Watanabe K, Tananka R, et al. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4 506-4 512.
- [6] 朱水芳. 实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测技术[M]. 北京:中国计量出版社, 2003:105-285.
- [7] 沈永才, 袁佩娜. 16S rRNA 荧光定量 PCR 法检测双歧杆菌[J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(2): 66-70.
- [8] Requena T, Burtpn J, Matsuki T, et al. Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2 420-2 427.
- [9] Vitali B. Quantitative detection of probiotic *Bifidobacterium* strains in bacterial mixtures by using real-time PCR[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26: 269-276.
- [10] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 167-173.
- [11] Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, et al. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR[J]. Biotechniques, 2003, 34(4): 804-813.
- [12] 庞睿. EMA-实时PCR检测乳制品中活双歧杆菌方法的建立[D]. 哈尔滨:东北农业大学硕士论文, 2007.
- [13] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999.
- [14] 樊蕴秀, 张敏, 蒋曙光. 牛粪中双歧杆菌检测方法的比较[J]. 乳品科学与技术, 2008, 31(4): 176-178.
- [15] 王超, 孟祥晨. 分子信标-实时PCR法快速检测双歧杆菌的研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1 163-1 168.

(下转第176页)

- tion in Combination with Gas Chromatography and Mass Spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2008, 1190: 342 - 349.
- [2] Ojala M, Kotiaho T, Siirila J, et al, Analysis of Aldehydes and Ketones from Beer as O-(2, 3, 4, 5, 6-Pentafluorobenzyl) hydroxylamine Derivatives[J]. Talanta, 1994, 41 (8): 1 297 - 1 309.
- [3] Vesely P, Lusk L, Basarova G, et al, Analysis of Aldehydes in Beer Using Solid-Phase microextraction with On-Fiber Derivatization and Gas Chromatography/Mass Spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 6 941 - 6 944.
- [4] 武千钧, 陈华磊, 杨朝霞, 自动顶空衍生化固相微萃取法测定啤酒中的老化醛类化合物[J]. 分析试验室, 2007, 26(4): 38 - 41.
- [5] Ochiai N, Sasamoto K, Daishima S, et al, Determination of Stale-Flavor Carbonyl Compounds in Beer by Stir Bar Sorptive Extraction with In-Situ Derivatization and Thermal Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2003, 986: 101 - 110.

Analysis of Aldehydes in Beer Using Headspace Solid Phase Microextraction with Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Wang Jing, Cui Weiwei, Wang Lina, Lin Zhiping

(Technological Center of Yanjing Beer Group Corporation, Beijing 101300, China)

ABSTRACT A method for the determination of 13 stale-flavor aldehydes in beer was developed with o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (PFBHA) derivation by Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) and GC-MS analysis. Different from the former studies, derivation and extraction process were performed in one step as the deriving reagent was directly added in beer sample and SPME fiber was then exposed into the sample vial. The optimized SPME conditions were at 50℃ for 60min with 65um PDMS/DVB fiber. GC-MS analysis was achieved by SIM mode using E-2-heptenal as internal standard. The method was shown good repeatability with RSD between 2.5% - 19.5% and the recoveries were ranged from 55.3 to 108.8%. The method was successfully applied to fresh and aged beer with good applicability.

Key words beer, stale flavor, aldehyde, Headspace Solid Phase Microextraction, GC-MS

(上接第 169 页)

Development and Application of Detection Kit for Viable Bifidobacteria in Dairy Products

Zhang Linfang, Meng Xiangchen

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Food Science & Technology

College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT Objective To establish a Real-Time and fluorescent quantitative PCR kit for detection of viable bifidobacteria in dairy products. Methods A Real-Time and fluorescent quantitative PCR kit is developed to detect viable bifidobacteria in dairy products with the method of EMA Real-Time PCR. Results The standard curve of determination of viable bifidobacteria by EMA Real-Time PCR was established. A fluorescent quantitative PCR kit was developed for detecting viable Bifidobacterium in dairy products. For this kit, the intra-assay and inter-assay coefficient of variation were both less than 5%, and cross-reaction with other lactic acid bacteria in dairy products didn't exist. The detection limit was 2×10^4 CFU/mL. This kit could be stored over 6 months at -20℃ and 3 months at 4℃. Among the 12 market yoghurt detected, the results obtained by kit were not significantly different from that obtained by the plate counting ($P > 0.05$). Conclusion The correlation coefficient of standard curve was more than 0.98. This kit was sensitive, specific and good repeated for detecting viable bifidobacteria in dairy products. This kit could be used to determine viable bifidobacteria in dairy products quantitatively.

Key words Bifidobacteria, Real-Time PCR, kit