

新技术在食品微生物检验检测中的应用

陈雯雯¹, 段文峰², 刘洋², 赵琨¹,

陶珊珊¹, 李云霞¹, 孙占刚³, 赵渝¹

(1. 上海师范大学 生命与环境科学学院 植物种质资源开发协同创新中心, 上海 200234;

2. 上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233; 3. 上海蔬菜食用菌行业协会, 上海 200030)

摘要: 现代社会中, 随着人们对食品要求的增加, 食品安全越来越成为人们关注的焦点, 因此寻求、建立快速检测食品微生物的方法十分必要. 简要介绍了几种新型的用于快速检验检测食品微生物的技术及其在实际检验检测中的应用.

关键词: 食品微生物; 食品检测; 代谢学技术; 分子生物学; 质谱技术

中图分类号: Q 939.37 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5137(2016)01-0121-06

随着人们生活水平的提高和现代食品业的快速发展, 人们对于食品的要求越来越高, 食品安全成为人们关注的重点. 然而无论是传统的发酵食品, 还是现在的新型发酵产品, 都在一定方面存在着潜在的危害, 每年关于由微生物引起的食品安全问题也层出不穷. 2011年, 一项关于食源性疾病的主动监测数据显示, 我国平均6.5人中就有1人次罹患食源性疾病^[1]. 因此, 建立快速检测食品微生物的方法在食品安全监控技术研究领域具有举足轻重的作用. 本文作者就目前几种新型的具有良好发展空间的食品微生物快速检测方法及其应用进行了介绍.

1 生理生化技术在食品微生物检测中的应用

生理生化技术(也称代谢学技术)是利用菌体在代谢过程中产生特异物质、分子等变化特性, 对菌种进行检测的方法. 主要包括ATP发光法、微量生化法等.

1.1 ATP生物发光法

ATP存在于所有活体生物中, 因此可以通过测定样品中的ATP浓度检测食品中的活菌数. ATP发光法通过发光光度计检测荧光素酶在ATP的作用下氧化荧光素所产生的荧光强度来检测菌量^[2]. 具有简便、省时、快速等特点, 还可以被用于大量食品样本中菌污染情况检测以及食品现场快速检测等.

ATP生物发光法近几年来在食品检测方面主要被用于乳制品中乳酸菌的检测、啤酒中菌落总数的检测、调味品即脱水蔬菜的细菌的测定等等^[3].

1.2 微量生化法

微量生化法包含微热量技法、放射测量法等. 前者是利用菌在生长过程中产生的热量变化来鉴别菌种; 后者是将微量的放射性标记物标记菌中生长所需要的碳水化合物, 通过测量菌种生长过程中产生的

收稿日期: 2014-12-13

基金项目: 上海师范大学食品安全与营养创新团队发展计划(DXLI23); 国家自然科学基金(31301486); 上海市自然科学基金(13ZR1439600); 上海市教委科研创新重点项目(14ZZ123)

通信作者: 赵渝, 中国上海市徐汇区桂林路100号, 上海师范大学生命与环境科学学院, 邮编: 200234, E-mail: zhaoyu@shnu.edu.cn

具有放射性的 CO_2 来测定食品中的菌量. 此类方法均具有快速性、准确性较高的优点^[4].

除了这两种技术之外, 电子阻抗法、接触酶测定技术因其所具有的优势在检测食品细菌方面也得到广泛应用. 其中电子阻抗法具有敏感性高、可重复、反应快速等优点而在食品微生物快速检测中应用广泛, 目前该方法主要被用于样品中大肠菌群、乳酸菌、酵母菌等^[5]的定量检测.

2 分子生物学技术在食品微生物检测中的应用

分子生物学方法早在 1996 年开始应用于食品微生物的检验检测中^[6]. 该方法是在基因水平上对目标微生物进行检测, 尤其是用于难培养或抗原结构复杂的微生物的鉴定与分型, 其中主要包括 PCR、核酸分子杂交及基因芯片等技术.

2.1 常规 PCR 技术及其在食品微生物检测中的应用

PCR (polymerase chain reaction), 是由美国的 Kary Mullis 等人建立的一种用于放大扩增特定的 DNA 片段的分子技术. 在 20 世纪末就以其灵敏度高、目标特异性强、快速等特点, 在微生物检测中得到大量应用. 现在此方法已经被用于精确地检测和鉴定乳制品中的乳酸菌、双歧杆菌以及酒类中的酵母菌、水源中的大肠杆菌和大肠菌群等^[7-9].

2.2 PCR 衍生技术在食品微生物检测中的应用

随着各种技术的不断发展, PCR 技术开始不断与新技术进行结合, 形成一些新的 PCR 衍生技术, 例如: qRT-PCR、PCR-DGGE、Multiplex PCR、LAMP 等.

qRT-PCR (实时荧光 PCR 技术), 最早于 2006 年被用于食品细菌的检测^[10]. 与常规 PCR 相比, 它具有特异性强、自动化程度高、避免污染等特点. qRT-PCR 技术近年来已在多种致病细菌、霉菌、酵母以及乳酸菌等重要食品微生物指标的定性和定量检测中被广泛应用^[11]. 张弛等采用多色荧光, 建立了同步检测食品中 3 种致病菌的 Taqman 多重荧光定量 PCR 法^[12].

PCR-DGGE, 是将 PCR 和变性梯度凝胶电泳分析技术相结合的一项技术. 理论上只要选择的电泳条件足够精细, 有一个碱基差异的 DNA 片段均可被分开^[13]. PCR-DGGE 技术具有检测不可培养类的细菌、高检测率、高重复性等优点. 现在, PCR-DGGE 技术主要被应用于发酵类食品^[14]、酿酒等食品的微生物检测与群落研究^[15].

与常规的 PCR 相比, Multiplex PCR 多被用于食品病原微生物的检验检测. 病原性食品菌主要包括沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、副溶血性弧菌等^[16-17], 除此之外, 该技术还被用于乳酸菌等食品非致病菌的检测.

LAMP (环介导等温扩增技术) 是 2000 年新开发的一种核酸扩增技术, 在食品细菌、真菌、寄生虫等检测中具有一定的应用^[18-19].

除此之外, 分子杂交技术在微生物检测中也有一定应用, 例如基因杂交技术, 主要被用于检测食品中的大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等^[20]; 基因芯片技术, 被应用于微生物的快速检测、基因表达、检测基因突变等方面, 为食源性疾病的诊断和防治提供了一定的依据^[21-22].

3 免疫学检测技术在食品微生物检测中的应用

免疫学检测技术是一类基于抗原—抗体特异性反应而形成的检测方法, 主要作用对象为目标微生物的某个特异基因的表达产物.

3.1 免疫磁性微球技术

免疫磁珠 (IMB) 是近几年发展起来的一项新型免疫学检测技术. 该技术将固化试剂特有的优点与免疫学反应的高度特异性结合于一体, 此外还具有高效、快速、可重复性好、操作简单和费用低等优点.

目前, 免疫磁性微球技术主要在食品样品 (如肉类、蔬菜、水果、牛奶等) 的致病微生物检测中得到了广泛应用. 此外, 因其高度的靶标特异性和下游良好的检测技术, 免疫磁珠技术已在大肠杆菌

O157:H7、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、单增李斯特菌以及耶尔森氏菌等重要食品微生物快速检验检测中得到广泛应用^[23-24]。

3.2 酶联免疫吸附技术

酶联免疫吸附技术(ELISA)是把抗原、抗体反应间的特异性与酶的高效作用有机结合的一种检测技术^[25]。该技术可以对待测物进行定性定量测定^[26]。

ELISA常用方法有间接法、竞争法和双抗体夹心法。前两者多适用于临床诊断,而后者主要被用于测定小分子抗原,在食品安全检测方面应用较多^[27]。Kumar等通过单克隆抗体双夹心法将海产品中副溶血性弧菌的检测灵敏度提高了千倍^[28];以新型碳纳米管作为固相吸附材料在沙门氏菌的检测中也取得较好效果^[29];ELISA还可与荧光分析技术结合用于乳制品的检测分析^[30]等。

除以上技术外,免疫检测的方法还有免疫层析技术^[31-32]、免疫荧光法(IFT)、免疫胶体金技术^[33-35]等。正由于免疫学检测技术的高效性、特异性等特点使得该类技术在未来的食品微生物检测中具有良好的发展空间。

4 质谱技术在食品微生物检测中的应用

质谱技术在食品微生物检测中的应用最早报道于1994年^[36]。在后基因组时代,转录组学、蛋白质组学以及代谢组学等为很多新型技术的产生提供了一定的技术支持。其中质谱(MS)和核磁共振(NMR)技术等食品微生物的快速检验检测中具有良好的发展前景。

在食品微生物检验方面,现在的质谱技术主要被应用于快速检验海产品中腐败菌^[37]和革兰氏阳性致病菌等菌种。Karola Böhme等将样品分离出的细菌,利用MALDI-TOF质谱进行鉴定,建立了含多个标准菌的光谱指纹图谱的提取峰列表,属特异性和种特异性的峰质量数可作为生物标记用于快速鉴定细菌^[38]。质谱技术在发酵型食品的菌种检验中也具有一定的应用^[39]。动物源双歧杆菌亚种的分类鉴定研究不在少数,分子生物学的方法常被用于区分这些亚种,但其不能满足工业上快速检验的需求,而质谱技术则可以达到工业需求。

在食品微生物快速检测中,现代质谱技术中的液相色谱分离技术和电子喷雾三重四级杆质谱联用(LC-ESI/MS/MS)是最常使用的^[40]。运用这些质谱技术可快速地检测出水果、蔬菜、酒、牛奶和肉类等食品中菌种污染情况^[41-42]。超高效液相色谱(UPLC)、气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)等均在食品微生物的检测中得到了一定的应用。

作为新技术,质谱技术目前在食品微生物检验方面已具有一定的基础,而该技术在食品微生物检测方面的应用却只是初见成效,但该技术依靠耗时短、操作简单、花费少等特点一定会在食品微生物检验检测方面得到更大的应用空间。

5 其他快速检测技术

除了以上所介绍的各种生物学方法外,研究者将这些技术与其他先进技术结合,得到一些特定的分析工具或者分析系统,从而达到快速鉴定的目的,如生物传感器技术、快速测试片^[43]、全自动微生物分析系统等等。

生物传感器技术是以生物化学和传感技术为基础,用生物活性物质作为分子识别元件,利用电子测量仪进行分析的技术^[44]。生物传感器技术中对目的DNA的测量时间明显缩短^[45],并且操作简单、灵敏度高、重复性好,使其成为了一种具有良好发展空间的新型的食品微生物测定技术。

全自动微生物分析系统是将传统的微生物生化反应和检测技术与现代计算机技术相结合的一种生物分析系统。可被用于鉴定由原料、产品中分离的微生物,并且不需要微生物纯化,就可以直接对样品中的特殊微生物种类和菌群进行检测^[46]。该技术所具有的操作简便、鉴定快速、准确可靠、高度自动化等特点^[47],适用于各类细菌的检验和鉴定,成为快速鉴定食品中微生物的较好方法之一。

6 小 结

随着食品安全问题的频繁发生,食品微生物的快速检测方法在食品安全和食品卫生检验方面的应用越来越广泛,生理生化技术、分子学、免疫学、质谱技术、生物传感器技术及指纹图谱技术等将成为食品微生物检测的有力手段,这些不断更新、完善的技术,更将以其快速、灵敏、简便等优点在食品微生物检验检测中发挥其重要的应用价值.

参考文献:

- [1] Wu H, Feng G L, Li X F, et al. Proteomics technology application in food microorganisms safety assessment and testing [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(11): 2791 – 2799.
- [2] Xie X Q. The comparison of rapid detection of food microorganism methods advantages and disadvantages [J]. *Quality and Technical Supervision*, 2013, 27(3): 2 – 7.
- [3] Hou Y, Wu X Q, Wang X H, et al. The principle and application of ATP bioluminescence [J]. *Chinese Medicine Guides*, 2010, 12(7): 12 – 18.
- [4] Wang W H, Zhang X W, Zhou J B, et al. Research progress on fast detection methods of foodborne pathogenic microbe [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2010, 27(4): 182 – 188.
- [5] Li Q. Microbial detection technology and its application in the food safety [J]. *Food Research and Development*, 2012, 9(33): 217 – 220.
- [6] Harmen H. DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms; development and implementation [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 33: 35 – 49.
- [7] Wang H, Liu B. The application of PCR technique in food microbiology [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(2): 63 – 67.
- [8] Zhu H H. The dynamic research of food fast testing based on biological technology [J]. *Science and Technol Information*, 2011(9): 2 – 2.
- [9] Zhang J X, Liang W, Cao X F, et al. The application of improving technology of PCR in food detection [J]. *China's agricultural information magazine*, 2011(11): 92 – 93.
- [10] Barry G, Sineda L, Martina W, et al. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2006, 59(2): 126 – 139.
- [11] Postollec F, Falentin H, Pavan S, et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) application in food microbiology [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(5): 848 – 861.
- [12] Zhang C, Yang J, Liu X M, et al. Three kinds of pathogenic bacteria in food Taqman multiple fluorescent quantitative PCR detection [J]. *Food Research and Development*, 2011, 32(4): 151 – 156.
- [13] Liu H F, Song H. PCR technology application in the detection of food microorganism and its improvement [J]. *Modern Agriculture*, 2012, 1: 34 – 36.
- [14] Xu A Q, Li Z J, Wang Y L, et al. Application of PCR-DGGE technique to detect fungi flora in fermented food and feed [J]. *Food Science*, 2010, 73(31): 317 – 322.
- [15] Si B, Xu J, Liao Y H, et al. Progress in PCR-DGGE technique and its application in Chinese liquor [J]. *China Brewing*, 2013, 6(32): 16 – 20.
- [16] Zhou B L, Xiao J W, Liu S F, et al. Establishment and application of a multiplex PCR assay for detection of three pathogenic bacteria in food [J]. *Food Science*, 2012, 37(6): 312 – 315.
- [17] Xu Y G, Cui L C, Li D D, et al. A multiplex polymerase chain reaction coupled with high performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens [J]. *Food Control*, 2012, 25(2): 778 – 783.
- [18] Hu L X, Zhang W, Zhang X Z, et al. Improved ring mediated isothermal amplification technology rapid detection of *Sakazakii* in infant formula milk powder [J]. *Journal of Microbiology*, 2009, 3: 378 – 382.

- [19] Jiang Y N, Man C X, Zhao F, et al. The establishment of PMA-LAMP detecting *oflisteria monocytogenes* [J]. Food Industry Science and Technology, 2011, 7: 410 - 412.
- [20] She S Y. The research progress and application of fluorescence in situ hybridization technology [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2011, 5(14): 129 - 131.
- [21] Liu C, Li H L, Liu F, et al. The harmful composition in dairy products detection technology is reviewed [J]. Food Science, 2013, 34(21): 425 - 430.
- [22] Li H Y, Zhang G X. Establishment of assay for detecting twelve foodborne pathogens by using visualized DNA microarray [J]. Journal of Inspection and Quarantine, 2009, 19(3): 17 - 21.
- [23] Zhang X, Xian Y. Immunomagnetic beads (IMB) and its application in food micro-biological testing [J]. Agricultural Quality and Standards, 2011, 1: 40 - 43.
- [24] Li M, Meng J, Zheng X P, et al. IMS-PCR single increases the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food [J]. Dairy Science and Technology, 2010(3): 131 - 134.
- [25] Shone C, Wiltion P-Smith, Appleton N, et al. Monoclonal antibody-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(1): 63 - 67.
- [26] Zhang Z J, Wang F H. Polymerase chain immune adsorption technology and its application in food safety testing [J]. Food Research and Development, 2011, 41(1): 157 - 159.
- [27] Wu Y R, Wang L M, Lou L, et al. Preparation of organophosphorus pesticide monoclonal antibodies against multiple antigens [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2009, 32(4): 94 - 99.
- [28] Kumar B K, Raghunath P, Devegowda D, et al. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 244 - 249.
- [29] Chunglok W, Oaew S, Dyah Kinasih Wuragil, et al. Immunoassay based on carbon nanotubes-enhanced ELISA for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26(8): 3584 - 3589.
- [30] Liu L, Yang S H, Ji S J, et al. Enzyme-linked immunosorbent determination of powder combined with fluorescence analysis in the process of accelerated storage products browning [J]. Food Science, 2013, 34(18): 249 - 252.
- [31] Xie S J, Wang J, Wang Z G, et al. Establishment of using colloidal gold immune chromatography technology rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2010, 33(2): 126 - 129.
- [32] Park J, Park S. Multiplex detection of pathogens using an immunochromatographic assay strip [J]. Bio Chip Journal, 2010, 4(4): 305 - 312.
- [33] Li X M, Luo P J, Tang S S, et al. Development of an immunochromatographic strip test for rapid detection of melamine in raw milk, milk products and animal feed [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(11): 6064 - 6070.
- [34] Robin C B, Jyotsna K, Yoqesh Nangia, et al. Gold nanoparticles catalyzed chemiluminescence immunoassay for detection of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. Analyst, 2011, 136: 2125 - 2130.
- [35] Li J, Zhao Y X, Peng S J, et al. Study on immune colloidal gold rapid detecting melamine in milk and dairy produce [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2010(3): 128 - 130.
- [36] Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology [J]. Clinical Microbiology Reviews, 1994, 7(1): 43 - 54.
- [37] Fernández-Noa I C, Böhmea K, Calo-Mata P, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus parauberis* from vacuum-packaging refrigerated seafood products [J]. Food Microbiology, 2012, 30: 91 - 97.
- [38] Böhmea K, Fernández-Noa I C, Jose M, et al. Assessment of fresh and processed seafood products by MALDI-TOF Mass fingerprinting [J]. Food and Bioprocess Technology, 2011, 4: 907 - 918.
- [39] Nicolaou N, Xu Y, Goodacre R. Detection and quantification of bacterial spoilage in milk and pork meat using MALDI-TOF MS and multivariate analysis [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84: 5951 - 5958.
- [40] Zhou Y H, Yin H Y. Mass spectrometry technology in the application of the modern nutrition and food analysis and detection [J]. Life Science, 2013, 2(25): 240 - 247.
- [41] Pedreschi R, Hertog M, Lilley K S, et al. Proteomics for the Food Industry: Opportunities and challenges [J]. Critical Re-

- views in Food Science and Nutrition,2010,50:680 – 692.
- [42] D'Alessandro A,Zolla L. Food safety and quality control:Hints from proteomics [J]. Food Technology and Biotechnology, 2012,50(3):275 – 285.
- [43] Xue F,Jiang Y S,Wang F, et al. Development of rapid test strip for detecting coliform bacteria in goose [J]. Journal of Henan University of Technology,2013,34(2):100 – 104.
- [44] Gang H L,He Z Y,Liu X H, et al. Microorganism in food detection method and application research [J]. Food Research and Development,2012,33(2):203 – 206.
- [45] Chen J B. Application of biosensors in food safety testing and research progress [J]. Food Research and Development, 2009,30(1):180 – 183.
- [46] Hong B C,Chen X B,Lai M H, et al. The research progress of rapid detection methods in food microorganisms [J]. Chinese Food and Nutrition,2013,19(6):15 – 18.
- [47] Sun Y P,Peng H,Ling X, et al. Application and appraisal results of the VITEK2 Compact automatic microbial analysis system [J]. Modern Preventive Medicine,2010,37(20):3891 – 3893.

The application of new technologies in food microbiological inspection and detection

CHEN Wenwen¹, DUAN Wenfeng², LIU Yang², ZHAO Kun¹,

TAO Shanshan¹, LI Yunxia¹, SUN Zhan'gang³, ZHAO Yu¹

(1. Delevopment Center of Plant Germplasm Resources, College of life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;

2. Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China;

3. Shanghai Vegetable and Edible Fungi Industrial Association, Shanghai 200030, China)

Abstract: In today's society, as people's demand for food increases, the problem of food safety is getting more and more concerns. Therefore it is very necessary to seek and to establish the rapid method detection of food microorganisms. This paper presents several new technologies for rapid detection of food microorganism and their application in the practical detection.

Key words: food microorganism; food testing; metabonomics technology; molecular biology; mass spectrometry

(责任编辑:顾浩然)