

小麦和玉米中微生物污染和生长的快速检测

翟焕趁¹, 张帅兵¹, 黄淑霞², 蔡静平¹

(1. 河南工业大学生物工程学院, 河南郑州 450001) (2. 河南工业大学粮食储运中心, 河南郑州 450001)

摘要: 为了快速检测粮食及加工品中真菌、细菌等微生物的污染及生长的状况, 选用了过氧化氢酶活性检测与经典的平板菌落计数检测进行对比试验。结果表明, 对灰绿曲霉菌 (*Aspergillus glaucus*)、黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等与粮食及加工品的储藏和流通品质及安全性密切相关的菌种进行梯度稀释菌悬液检测时, 过氧化氢酶法检测值的相对偏差较小, 且线性相关性系数均达到或大于 0.99, 其检测值与平板菌落计数法检测值的相关性系数均大于 0.95。对于不同微生物污染程度的粮食及加工品, 两种方法的检测数值变化趋势完全一致。相对于同一带菌量的样品, 当粮食或加工品中的微生物处于生长状态时, 过氧化氢酶检测法显示出更高的检测灵敏度, 酶活性检测值超过微生物非生长态下同一带菌量样品检测值 2 倍以上。因此, 过氧化氢酶检测法可以作为检测粮食及加工品中微生物污染及生长状况的有效手段。

关键词: 真菌; 细菌; 酶活性; 农产品; 检测

文章编号: 1673-9078(2014)8-231-237

Rapid Detection of Microbial Contamination and Growth in Wheat and Corn

ZHAI Huan-chen¹, ZHANG Shuai-bing¹, HUANG Shu-xia², CAI Jing-ping¹

(1. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China)

(2. Research Center of Grain Storage & transport, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: To detect contamination and growth of fungi, bacteria, and other microorganisms in grain and its processed products rapidly, a comparative experimental study was conducted by using catalase activity detection and plate culture count methods. For this purpose, gradient dilutions were used in *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus flavus*, *Bacillus subtilis*, and other microbial suspensions, which are closely related to the quality and safety of grain and its processed products during storage and circulation. The results showed that for the method involving detection of catalase activity, deviations were relatively small, all linear correlation coefficients were equal to or more than 0.99, and the correlation coefficients between the measured values using this method and those obtained using the plate count method were greater than 0.95. For grain and its processed products with different degrees of microbial contamination, the change in the trend of the measured values using the two methods was consistent. For samples with the same type of microorganisms in grain and its processed products, the catalase activity detection method showed relatively high sensitivity. Additionally, when these microorganisms were in the growth state, the values for enzyme activity were two times higher than that when they were not in the growth state. Therefore, the method based on catalase activity detection is an efficient method to detect contamination and growth of microorganisms in grain and its processed products.

Key words: fungi; bacteria; enzyme activity; agricultural products; detection

粮食在种植和生产的各环节中会被真菌或细菌等各种微生物污染, 作为粮食制品、食品或饲料的原料, 粮食中携带的微生物数量及生长状况均对下游产品构成关键性的影响, 其中包括食品的风味、保质期甚至

收稿日期: 2014-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271948); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2013CB127804); 河南省教育厅自然科学基金项目 (14A180004)

作者简介: 翟焕趁 (1975-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 粮食中的真菌及其毒素

通讯作者: 蔡静平 (1957-), 男, 教授, 研究方向: 粮油、食品微生物

食品安全性。例如, 一些面制食品的原料面粉中如果耐热菌和产芽孢细菌含量较高, 其产品的品质和保质期就会受到影响, 需要在面粉生产中通过控制粮食原料的带菌状态或在加工中进行针对性的处理减少带菌量^[1]。为了满足现代食品制造业对生产原料品质和安全性的要求, 需要对粮食及加工品中的微生物污染水平进行检测; 对于品质要求高的食品加工, 所选择的初始原料带菌量必须在较低的水平, 尤其不能在粮食储藏等环节中出现微生物的生长繁殖, 否则不仅粮食自身品质会发生劣变, 而且微生物生长的代谢产物

还会导致食品安全性的风险。在生产环节中进行的微生物检测还必须具备快速的特性,以便及时了解微生物污染水平和生长状态的检测结果,为管理者提供决策参考。经典的针对粮食原料或产品中带菌量微生物检测技术—平板培养方法对于细菌检测需要24 h~48 h,霉菌检测需要5 d~7 d,显然在检测速度方面已经不能满足具体生产的需要^[2]。

近年来,人们已经研发了许多快速检测农产品中微生物污染状况的有效方法。例如利用PCR检测技术可以对农产品中所污染的真菌和细菌(尤其是一些致病性细菌)进行检测^[3-4];通过测定牛奶等原料中ATP含量的方法可快速检测细菌含量^[5]以及通过检测基质过氧化氢酶活性分析好氧菌的生物量^[6]。相比较而言,在针对农产品带菌状况快速检测的各种方法中,过氧化氢酶测定相对简便,并且粮食及其加工品的危害性微生物主要是好氧的真菌及细菌,它们都具有过氧化氢酶活性;同时,过氧化氢酶检测技术也被不断创新和发展,弥补了经典滴定法检测相对误差大的缺陷,已经显示出良好的应用前景。在具体的检测技术上也不断出现适合检测对象的测定方法,如已研发出灵敏度较好的生物传感器检测法^[7],酶反应微气柱检测法^[8]等方法。为了扩展过氧化氢酶活性变化信息在农产品变质和食品安全性方面的应用,本文报道利用氧传感器构成、基于过氧化氢酶活性的快速检测仪检测方法,与经典的平板菌落培养计数检测方法进行比较,研究对粮食及其加工品中微生物含量、生长状态的检测特性。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料和试剂

试验粮:试验小麦、稻谷、玉米等原粮,在郑州粮食市场和国家储备粮库中购买或采集;小麦粉、玉米粉,购自郑州超市产品种类较多的品牌商品。

霉菌检测培养基为改良查氏培养基:硝酸钠0.2%,磷酸二氢钾0.1%,氯化钾0.05%,硫酸镁0.05%,硫酸亚铁0.001%,氯化钠6%,蔗糖3%,琼脂2%,蒸馏水配制,121℃灭菌15 min备用。

细菌检测培养基选用肉汤培养基,按照规定的添加量称取营养琼脂,加热溶化后装入三角瓶中,121℃灭菌15 min备用。

霉菌生长状态小麦(霉菌为小麦自身携带):将小麦增水调节水分至16.6%,存放在30℃下,使所含的霉菌处于生长状态。

霉菌非生长状态小麦:将霉菌大量生长的小麦进行干燥,在30℃下存放50 d,所含霉菌进入稳定的休眠状态,然后与不同比例的普通小麦混合,形成霉菌处于非生长状态、且霉菌含量不同的样品。

芽孢菌生长状态玉米粉(芽孢菌为玉米粉中自身携带):由灭菌玉米粉加枯草芽孢杆菌悬液调节水分至25.6%,存放在30℃下,使所含的枯草芽孢杆菌处于生长状态。

芽孢菌非生长状态玉米粉:将灭菌后的高水分玉米粉接种枯草芽孢杆菌后进行培养,然后进行干燥处理,在30℃下存放50 d,与灭菌玉米粉混合,制成带菌量不同、芽孢杆菌处于非生长状态的玉米粉。

主要试剂:琼脂,Beijing Solabio Science & Technology Co.Ltd;营养琼脂,北京奥博星生物技术有限责任公司;蔗糖,氯化钠(分析纯),北京化工厂;磷酸二氢钾,氯化钾(分析纯),天津市化学试剂六厂;硝酸钠(分析纯),河南焦作市化工三厂;30%过氧化氢:分析纯,洛阳市化学试剂厂;其余试剂均为市售分析纯产品。

纯菌种试验的霉菌和细菌:灰绿曲霉菌(*Aspergillus glaucus*)、黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)为本实验室从霉变粮食中分离并保藏于4℃冰箱中的菌种;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为本实验室从市售面粉中分离,经形态学和生理试验鉴定并在4℃冰箱中保藏的菌种。

1.1.2 试验仪器

主要仪器:模拟储藏及培养设备:恒温、恒湿培养箱,KMF 720型,由德国Binder GmbH制造;电热恒温培养箱,HG303-4型,南京实验仪器厂制造。

过氧化氢酶活性检测仪器,SK.WJH-2型,四川华粮仓储设备有限公司制造;该装置有一个装有氧传感器,可以控制温度和液体搅拌、不锈钢材质并具气密性的反应罐,一套控制系统和一个显示器组成。

1.2 试验方法

1.2.1 平板菌落计数法

霉菌检测:称取25 g粮食样品,加入到含225 mL无菌水和20颗直径5 mm玻璃球(在震荡期间起辅助孢子分散作用)的三角瓶中,在康氏振荡器中振荡30 min制成菌悬液,稀释到 10^{-2} ~ 10^{-5} 稀释度;每个稀释度做3个平行,加改良察氏培养基,28℃培养,5 d计数,7 d后对于形成的菌落逐个进行菌落形态菌种分析鉴定;对于不易通过菌落直接辨别的菌种,挑取菌落制成玻片,在显微镜下观察菌体和繁殖体,从而分别将培养皿中形成的菌落鉴定到真菌的属或种。

细菌总数和芽孢菌检测：称取25 g样品，加入到含225 mL无菌水的三角瓶中，在康氏振荡器中振荡30 min制成菌悬液，稀释到 10^{-4} ~ 10^{-7} 稀释度；每个稀释度做3个平行，加肉汤培养基，37℃培养，48 h计数；芽孢菌的检测是将相应稀释度的菌悬液在沸水浴中加热3 min后按照细菌总数检测相同的方法检测。

1.2.2 过氧化氢酶活性检测方法

检测粮食的过氧化氢酶活性是将100 g粮食用无菌水振荡洗涤，制成500 mL菌悬液，置于检测仪的检测容器中（粉状粮食加工品直接加无菌水制成乳液）。启动仪器的加热功能使反应液恒温至30℃（控制温度偏差为 $\leq \pm 0.5$ ℃），在反应容器中加入10 mL 30% H_2O_2 ，后密封容器上盖并开始检测，反应容器中的磁力搅拌装置控制转子以300 r/min的速度搅拌反应液，10 min后在显示屏中显示和记录反应液的过氧化氢酶活性检测值。过氧化氢酶活性单位定义为：由传感器检测反应容器中过氧化氢酶催化分解 H_2O_2 产生的氧气，当传感器产生1微安的电流时定义为1过氧化氢酶活性单位。实际检测时，通过空白试验将环境气体状态的检测值自动扣除，并将酶催化产生的电流变化（ μA ）直接以酶活性单位的形式实时显示在屏幕中。检测到达设定的时间后，仪器可自动记录检测值。

1.2.3 粮食及加工产品加湿方法

将粮食及加工产品按比例加入一定量的无菌水，均匀混合，然后置于10℃以下的冷藏箱中存放，平衡时间设定为48 h，调成所需试验水分含量的样品。

1.2.4 粮食及加工产品模拟储藏方法

将调好水分的粮食及加工产品装入1000 mL广口瓶中，用多层棉纱布覆盖，置于恒温恒湿箱中，调节湿度接近各种粮食及加工品的平衡水分，保持试验样品水分的稳定性。本试验在整个试验期中样品的水分变化低于0.5%。

1.2.5 数据处理方法

使用 spss 17 软件进行试验数据的统计学分析。

2 结果和讨论

2.1 粮食及加工品主要微生物类群纯菌种的

检测比较

在收获后的粮食上生长和危害的真菌属于过氧化氢酶阳性类群^[9]，在面粉等粮食加工品中与加工品质密切相关的一些耐热性细菌也具有过氧化氢酶活性。如果菌体中的过氧化氢酶活性值与带菌数量具有良好的相关性，则利用过氧化氢酶活性检测的方法就可以

间接检测这些基质中的带菌量。更为关键的是酶活性检测不需像平板菌落培养计数方法那样要经数天培养后才能得到检测结果，只需要将样品加水振荡成菌悬液，在容器中与过氧化氢进行保温反应，用传感器测量产生的氧气即可获得检测数据，检测一个样品耗时为15 min，因而，比其他检测方法可更快捷地了解粮食及加工品中的微生物数量，在商品储藏和流通环节中具有重要的意义。虽然酶活性检测对于具体的微生物种群缺乏特异性，但粮食及加工品作为非直接食用的原料，所携带的微生物可以在食品加工的高温处理中被杀灭，因此，具体的微生物种类甄别没有必要，需要重点关注的是粮食及加工品中决定产品的品质和商业价值的带菌数量或其生长的状况。

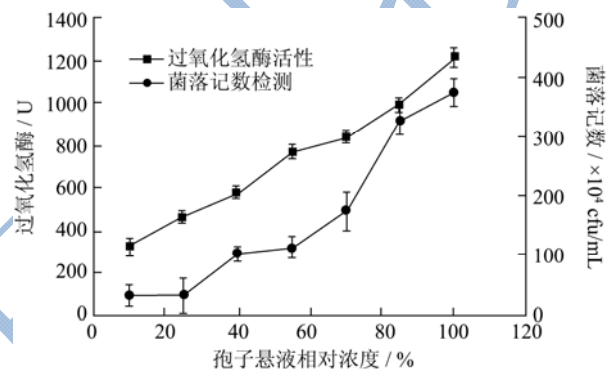


图1 灰绿曲霉菌检测比较

Fig.1 The comparison of *Aspergillus glaucus* detection

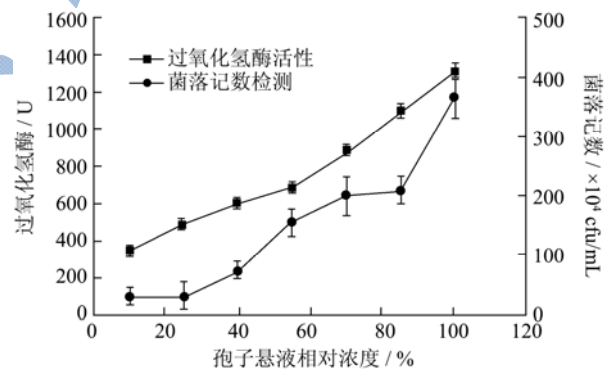


图2 黄曲霉菌检测比较

Fig.2 The comparison of *Aspergillus flavus* detection

本试验选择了粮食流通环节中最易生长的干生性霉菌-灰绿曲霉菌 (*Aspergillus glaucus*)，在粮食中可以产生真菌毒素的黄曲霉菌 (*Aspergillus flavus*)^[10]，以及在粮食加工产品中需要重点控制的耐热芽孢细菌-枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 作为试验菌^[11]，将它们的分生孢子或菌体细胞悬液进行梯度稀释，使理论菌体浓度变化为线性关系，然后分别用经典的平板菌落培养计数和过氧化氢酶活性检测方法进行比较试验，结果显示（图1、图2、图3），两种方法均能反映菌体生物量的变化，但过氧化氢酶活性法检测值的

标准差明显低于平板菌落培养检测方法,将标准差与检测值相比,过氧化氢酶活性检测法的偏差比例是2.8%~11.4%,平板菌落培养计数法是6.5%~49.2%,即过氧化氢酶法对于平行样品的检测偏差更小。导致不同检测偏差的原因应该是平板菌落培养计数法在试样经无菌水振荡制成菌悬液时,如果有些真菌的孢子或细菌的菌体仍然粘联在一起,培养后只能形成一个菌落;或者在菌落过于密集的部位有些菌体不能形成菌落,使得检测误差增大。过氧化氢酶活性检测时,不管菌体是否粘联,由于底物的流动性,加上检测时的机械搅拌,菌体中的酶均可对底物进行正常的催化反应,使得引起平板菌落培养检测方法误差的各种因素不会影响酶活性的检测结果。另一方面,电子传感器的检测稳定性较高,检测的相对偏差比较小。因此,过氧化氢酶方法检测霉菌孢子或细菌数量具有更高的精度,对于判断微生物的污染水平有较好的参考价值。

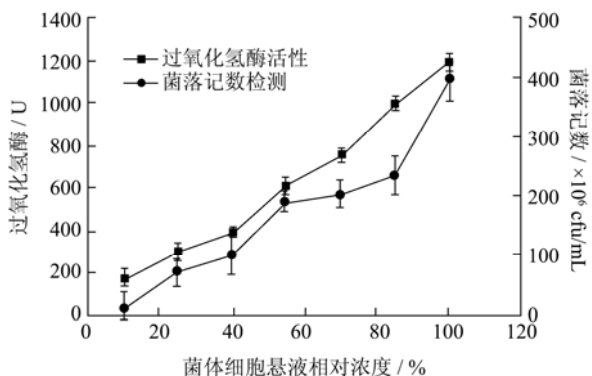


图3 枯草芽孢杆菌检测比较

Fig.3 The comparison of *Bacillus subtilis* detection

表1 平板菌落计数与过氧化氢酶活性检测相关性比较

Table 1 The correlation comparison of catalase activity and plate colony count detection

| 种类 | 菌悬液梯度检测的线性相关性系数r 两种检测方法的相关性系数 | | |
|--------|-------------------------------|--------|--------|
| | 菌落计数法 | 过氧化氢酶法 | |
| 灰绿曲霉 | 0.9543 | 0.9938 | 0.9523 |
| 黄曲霉 | 0.9565 | 0.9901 | 0.9624 |
| 枯草芽孢杆菌 | 0.9627 | 0.9918 | 0.9672 |

进一步对上述线性梯度稀释的菌悬液检测值进行线性相关性系数分析(表1),可以发现,平板菌落培养计数法对于灰绿曲霉、黄曲霉和枯草芽孢杆菌检测的线性相关性系数分别为0.9543、0.9565和0.9627,而过氧化氢酶活性检测则均大于0.99,分别为0.9938、0.9901和0.9918,显然过氧化氢酶活性检测法更接近理论菌体浓度的变化,可以更敏感地反映菌体数量的变化。尽管平板菌落计数方法存在误差较大的现象,但它仍是农产品、食品带菌量检测最常用的方法,也是许多检测标准规定的方法(如GB 4789.2-2010),

因而过氧化氢酶活性作为间接检测方法仍需比较与规定方法的相关性。对检测数据的分析表明(表1),两种检测方法的相关性系数均大于0.95,证明其相关性较为理想。

2.2 不同自然带菌状态的粮食及加工品检测

效果比较

在粮食及加工品中会带有各种类型的微生物类群,可能同时含有细菌和真菌,其特性可能包含过氧化氢酶阴性和阳性的微生物类群。尽管现有的各种商业性微生物检测方法可能只对商品质量或安全有关的类群进行检测,但作为间接检测微生物的过氧化氢酶检测方法仍需要与平板菌落计数这一常规检测方法进行比较,了解两种检测数据之间的关系。本试验分别采集了不同来源的小麦、稻谷和玉米三类粮食,分别进行平板菌落计数法和过氧化氢酶法检测,结果表明(表2),各粮食样品的带菌量不同,主要带菌类群也有一定的差异。如带菌量较低的粮食一般主要为田间寄生型的真菌为主,或者以粮食中初始性生长的灰绿曲霉为主,带菌量较高的粮食主要为霉腐型的黑曲霉、黄曲霉等真菌为主。在各粮食品种不同的样品中,带菌的状况差异也较大,但过氧化氢酶活性检测值与平板菌落计数法检测的带菌量数值变化趋势完全一致,两种检测方法的检测结果之间有严格的对应关系。进一步对不同检测样品的分辨度上进行差异显著性分析,结果显示(表2),过氧化氢酶检测法对小麦、稻谷和玉米各8个样品的检测值均有显著差异($P < 0.05$),平板菌落计数检测法对小麦和稻谷的检测只有4组数据组间显著差异($P < 0.05$),对玉米有5组数据组间显著差异($P < 0.05$),显示过氧化氢酶检测粮食中真菌含量有更高的分辨率。

粮食加工品的检测试验材料为小麦粉和玉米粉,主要针对细菌总数和芽孢菌总数进行检测比较。试验结果表明(表3),采用平板菌落计数法检测样品中的细菌总数和芽孢菌总数,两者成正比关系。不同细菌量和芽孢含量的样品采用过氧化氢酶法进行检测也表现出相同的趋势,并且过氧化氢酶法检测同样表现出更高的分辨率。

2.3 对粮食及加工品中不同生长状态微生物

的检测效果

粮食及加工品中均携带各种微生物,其带菌量受产地、气候、品种及储藏等因素的影响有较大的差异

性。如果携带的这些微生物在储藏和流通环节中没有生长、繁殖现象，它们不会直接对粮食及加工品的品质造成任何影响。当粮食及加工品中存量或新污染的微生物出现生长和代谢活动时，不仅食用和加工工艺品品质会受到影响，而且产生的有害代谢产物将导致食

品安全性的问题^[12]。但对于真菌而言，在没有形成子代孢子时，平板菌落计数检测不会对真菌的生长做出数量变化的响应。显然，这一特性不利于监测微生物早期生长产生的危害活动，对于保障储藏和流通环节中粮食及加工品的良好品质是严重的缺陷。

表2 粮食样品的真菌平板菌落计数与过氧化氢酶检测

Table 2 Detection of catalase activity and plate colony count for fungi in grain samples

| 样品 | 平板菌落计数法 | 过氧化氢酶法 | 主要真菌类群 | |
|----|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | /($\times 10^4$ cfu/g) | /U | | |
| 小麦 | 1 | 8.6 \pm 1.2 ^a | 167 \pm 3.6 ^a | 链格孢霉, 灰绿曲霉, 串珠镰刀菌, 枝孢霉 |
| | 2 | 21.3 \pm 6.2 ^a | 203 \pm 2.1 ^b | 链格孢霉, 灰绿曲霉, 青霉, 禾谷镰刀菌 |
| | 3 | 51.1 \pm 8.6 ^b | 268 \pm 3.8 ^c | 链格孢霉, 灰绿曲霉, 串珠镰刀菌, 青霉 |
| | 4 | 72.3 \pm 9.8 ^b | 312 \pm 5.9 ^d | 灰绿曲霉, 青霉, 白曲霉, 串珠镰刀菌 |
| | 5 | 106.8 \pm 12.3 ^c | 350 \pm 4.9 ^e | 灰绿曲霉, 黄曲霉, 棕曲霉, 杂色曲霉, 青霉 |
| | 6 | 135.4 \pm 20.2 ^c | 399 \pm 6.1 ^f | 青霉, 黄曲霉, 黑曲霉 |
| | 7 | 166.8 \pm 16.3 ^c | 438 \pm 7.1 ^g | 黄曲霉, 棕曲霉, 青霉 |
| | 8 | 205.8 \pm 23.1 ^d | 568 \pm 8.2 ^h | 黄曲霉, 黑曲霉 |
| 稻谷 | 1 | 18.2 \pm 4.2 ^a | 238 \pm 4.5 ^a | 枝孢霉, 三线镰刀菌, 青霉 |
| | 2 | 27.5 \pm 5.8 ^a | 296 \pm 3.8 ^b | 蠕孢霉, 串珠镰刀菌, 弯孢霉, 灰绿曲霉 |
| | 3 | 63.3 \pm 9.5 ^b | 336 \pm 4.2 ^c | 枝孢霉, 灰绿曲霉, 青霉, 棕曲霉 |
| | 4 | 91.4 \pm 12.4 ^b | 379 \pm 6.3 ^d | 灰绿曲霉, 白曲霉, 青霉, 棕曲霉 |
| | 5 | 146.5 \pm 16.3 ^c | 463 \pm 8.2 ^e | 灰绿曲霉, 白曲霉, 棕曲霉, 杂色曲霉 |
| | 6 | 171.3 \pm 21.1 ^c | 506 \pm 9.8 ^f | 黑曲霉, 黄曲霉, 杂色曲霉 |
| | 7 | 211.1 \pm 26.1 ^d | 593 \pm 12.1 ^g | 黄曲霉, 杂色曲霉, 青霉 |
| | 8 | 235.7 \pm 19.8 ^d | 668 \pm 11.2 ^h | 黄曲霉, 青霉 |
| 玉米 | 1 | 18.8 \pm 2.9 ^a | 113 \pm 3.9 ^a | 串珠镰刀菌, 链格孢霉, 禾谷镰刀菌, 枝孢霉 |
| | 2 | 42.3 \pm 5.1 ^b | 175 \pm 3.3 ^b | 链格孢霉, 串珠镰刀菌, 灰绿曲霉 |
| | 3 | 86.3 \pm 11.3 ^b | 251 \pm 5.8 ^c | 灰绿曲霉, 串珠镰刀菌, 青霉 |
| | 4 | 133.1 \pm 23.1 ^c | 402 \pm 9.2 ^d | 灰绿曲霉, 棕曲霉, 黄曲霉, 青霉, 串珠镰刀菌 |
| | 5 | 194.2 \pm 19.5 ^c | 566 \pm 12.1 ^e | 青霉, 黄曲霉, 黑曲霉, 串珠镰刀菌 |
| | 6 | 259.5 \pm 29.3 ^d | 712 \pm 21.3 ^f | 黄曲霉, 黑曲霉, 串珠镰刀菌 |
| | 7 | 301.5 \pm 36.2 ^d | 879 \pm 31.2 ^g | 黄曲霉, 杂色曲霉, 青霉 |
| | 8 | 376.6 \pm 31.2 ^e | 1021 \pm 42.3 ^h | 黑曲霉, 青霉, 白曲霉 |

注: 表中角标的字母表示: 同一类粮食和检测方法相同的字母表示没有显著差异性 (P>0.05), 不同字母表示有显著差异性 (P<0.05)。

表3 粮食加工产品的细菌平板菌落计数与过氧化氢酶检测

Table 3 Detection of catalase activity and plate colony count for bacteria in processed grain products

| 样品 | 小麦粉 | | | 玉米粉 | | |
|----|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | 平板菌落计数 (细菌总数 $\times 10^3$ /g) | 平板菌落计数 (芽孢菌数 $\times 10^3$ /g) | 过氧化氢 酶法/U | 平板菌落计数 (细菌总数 $\times 10^3$ /g) | 平板菌落计数 (芽孢菌数 $\times 10^3$ /g) | 过氧化氢 酶法/U |
| 1 | 3.8 \pm 1.1 ^a | 1.5 \pm 0.2 ^a | 68 \pm 1.5 ^a | 7.3 \pm 1.5 ^a | 2.1 \pm 0.2 ^a | 86 \pm 1.3 ^a |
| 2 | 5.2 \pm 1.6 ^a | 2.3 \pm 0.6 ^a | 93 \pm 1.1 ^b | 11.4 \pm 2.6 ^a | 3.4 \pm 1.2 ^a | 113 \pm 1.7 ^b |
| 3 | 9.5 \pm 1.3 ^a | 4.6 \pm 0.9 ^a | 125 \pm 1.5 ^c | 18.5 \pm 2.3 ^b | 6.6 \pm 1.9 ^a | 142 \pm 1.9 ^c |
| 4 | 13.7 \pm 2.2 ^b | 7.1 \pm 1.4 ^b | 159 \pm 1.9 ^d | 23.7 \pm 2.1 ^c | 11.1 \pm 2.4 ^b | 189 \pm 2.1 ^d |
| 5 | 18.6 \pm 2.8 ^b | 9.2 \pm 1.3 ^b | 197 \pm 2.2 ^e | 31.6 \pm 3.8 ^d | 19.2 \pm 2.3 ^b | 231 \pm 2.5 ^e |

注:表中角标的字母含义与表2相同。

对霉菌处于生长和非生长状态的小麦样品分别用平板菌落计数法和过氧化氢酶法进行检测,试验结果表明(图4,图5),无论样品中的微生物是否处于生长状态,过氧化氢酶活性均随着微生物数量的增多而升高;统计分析得出两种检测方法对样品中微生物生长或不生长状态数量变化的检测值相关性系数均大于0.99,说明过氧化氢酶检测与平板菌落计数法一样,可以对粮食及加工品中微生物的生长进行检测。

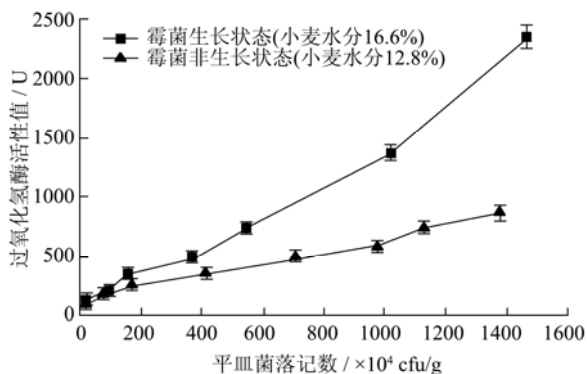


图4 粮食中真菌生长状态对检测的影响

Fig.4 The effect of fungal growth status on catalase detection in grain

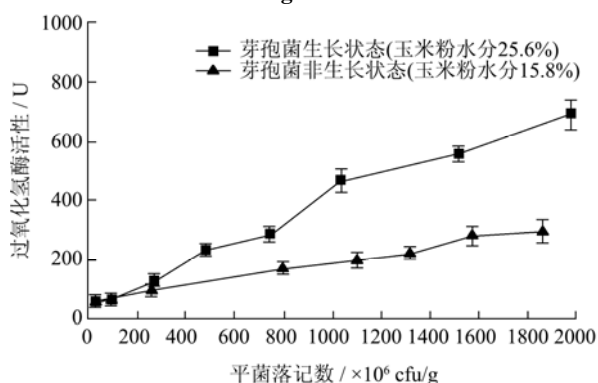


图5 粮食加工品中细菌生长状态对检测的影响

Fig.5 The effect of bacterial growth status on catalase detection in processed grain

进一步分析图4、图5的检测结果还可发现,相对于某一平板菌落计数检测值的样品,当微生物处于生长状态时,检测到的过氧化氢酶活性值均超过微生物处于非生长状态的2倍或更高,其差异性非常显著($P < 0.01$)。而且随着高水分的小麦和玉米粉培养时间的延长,当微生物的生长明显加快时,与相同含菌量、非生长状态的样品相比,过氧化氢酶活性升高值更大。这一现象说明,利用过氧化氢酶活性检测的方法可以更加灵敏地检测粮食及加工品中微生物的生长现象。在实际检测中,只要发现过氧化氢酶活性达到某一数值,或发现同一基质两次检测的数值有显著升高现象($P < 0.05$),即可推算出微生物的生长量。

根据 Hansberg 等人的研究^[9],处于生长中的好氧性微生物必须合成更多的过氧化氢酶才能消除代谢期间形成的过氧化物。在本试验中也发现,在粮食或加工品中的微生物刚开始生长时,基质上的带菌数量并没有明显增加,但检测样品的过氧化氢酶活性数值有显著升高,且微生物生长速率的增大可使代谢更加活跃,过氧化氢酶活性增幅更大。鉴于过氧化氢酶活性检测只需10 min多即可完成,远快于平板菌落计数法需要耗时数天的检测过程,因此,对于储藏、加工及流通领域中的粮食及加工品,利用简便、快捷的过氧化氢酶活性检测方法可以更早地发现潜在的微生物生长危害风险,前移预警微生物危害的时间点,为高效防控提供科学依据。

3 结论

微生物活动是引起粮食及加工品质量变化主要因素,它们的生长和代谢产物释放还会导致严重的食品安全问题。本试验采用检测样品中过氧化氢酶活性的方法了解粮食及加工品中微生物的污染或生长状况具有操作简单、快速,检测耗时远小于经典的平板菌落计数检测方法对比试验和数据的相关性分析,证明过氧化氢酶活性检测法可以准确测定灰绿曲霉、黄曲霉等对粮食储藏和流通安全重要的真菌,对枯草芽孢杆菌这一粮食加工品中需要控制的耐热性芽孢菌的检测也具有高达0.95以上的相关性系数。针对不同微生物污染状态的粮食和加工品,过氧化氢酶活性检测值与平板菌落计数法检测的带菌量数值变化趋势完全一致,两种检测方法的检测结果之间有严格的对应关系,可以适用于检测各类粮食或加工产品。当粮食或加工品中的微生物处于生长状态时,相对于同一带菌量,过氧化氢酶检测值增大幅度非常显著高于平板菌落计数的检测值($P < 0.01$),因而可以有效放大微生物在粮食及加工品中生长危害的信号,提高对微生物危害监测的灵敏度,对于早期预警微生物的危害性活动,保障粮食和加工品的安全性具有重要的意义。

参考文献

- [1] 曾朝珍,张晓琳,俞建民,等.小麦粉生产过程中微生物的变化规律研究[J].现代食品科技,2008,24(9):861-864
ZENG Chao-zhen, ZHANG Xiao-lin, YUN Jian-min, et al. Quantitative changes of microorganism in wheat flour processing [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(9):861-864

- [2] Rosmini M R, Signorini M L, Schneider R, et al. Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk [J]. *Food Control*, 2004, 15(1): 39-44
- [3] Settanni L, Corsetti A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69(1): 1-22
- [4] Fernández-No I C, Guarddon M, Böhme K, et al. Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(3): 605-610
- [5] Valat C, Champiat D, N'Guyen T T, et al. Use of ATP bioluminescence to determine the bacterial sensitivity threshold to a bacteriocin [J]. *Luminescence*, 2003, 18(5): 254-258
- [6] 蔡静平, 蒋澎, 张燕燕, 等. 储粮早期霉变监测方法测试研究[J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(11): 58-62
Cai Jing-ping, Jiang Peng, Zhang Yan-yan et al. Testing of methods for monitoring early Fungi growth of stored grain spoilage [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013, 28(11): 58-62
- [7] Serra B, Zhang J, Morales M D, et al. A rapid method for detection of catalase-positive and catalase-negative bacteria based on monitoring of hydrogen peroxide evolution at a composite peroxidase biosensor [J]. *Talanta*, 2008, 75(4): 1134-1139
- [8] Rebecca J Y, Vivian C H W. Use of a simple catalase assay for assessment of aerobic microbial contamination on vegetables [J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 61(2): 231-236
- [9] Hansberg W, Salas-Lizana R, Dominguez L. Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2012, 525(2): 170-180
- [10] Magan N, Aldred D, Mylona K. Limiting mycotoxins in stored wheat [J]. *Food Additives and Contaminants*, 2010, 27(5): 644-650
- [11] Lanier C, Richard E, Heutte N, et al. Airborne molds and mycotoxins associated with handling of corn silage and oilseed cakes in agricultural environment [J]. *Atmospheric Environment*, 2010, 44: 1980-1986
- [12] Kaaya A N, Kyamuhangire W. The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda [J]. *International journal of food microbiology*, 2006, 110(3): 217-223