

大肠菌群特异性检测荧光底物 MUGal 的合成及应用

马延霞^{1,2,3}, 吴清平², 张菊梅², 郭伟鹏², 韦献虎^{1,2,3}

(1. 中国科学院广州化学研究所, 广东广州 510650) (2. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070)

(3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃半乳糖苷 (MUGal) 是食品安全中重要指示菌大肠菌群的特异性快速检测荧光底物。本文采用相转移催化方法使 4-甲基伞形酮 (4-MU) 和四乙酰基-α-D-吡喃溴代半乳糖缩合生成保护的糖苷, 再在碳酸钠的水/甲醇溶液中去保护生成 4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃半乳糖苷。通过对温度、时间和催化剂量对糖苷化一步产率的研究发现, 当温度为 30 °C, 反应时间为 16 h 时, 产率最高可达 73.12%。醇解反应一步以碳酸钠为碱产率可达 91.01%。在对产物进行 IR 和 ¹H NMR 结构表征后, 进一步将产物应用于大肠菌群显色培养基, 并和进口底物比较, 其产荧光管数经 X² 检验无显著性差异 (P>0.05), 在实际样品检测中, 采用 GB4789.3-2010 (48 h) 和 MUGal 方法 (24 h) 的阳性检出率均为 80%, MUGal 方法的检出时间明显缩短。因此, 本研究制备的荧光底物能和进口产品相媲美, 可以作为进口底物的替代品。

关键词: 4-甲基伞形酮基-β-D-吡喃半乳糖苷; 相转移催化; 大肠菌群; 月桂基硫酸盐胰蛋白酶肉汤 (LST)

文章编号: 1673-9078(2014)8-251-257

Synthesis and Application of MUGal which is the Specific Fluorescent Substrate for Detection of Coliform

MA Yan-xia^{1,2,3}, WU Qing-ping², ZHANG Ju-mei², GUO Wei-peng², WEI Xian-hu^{1,2,3}

(1. Guangzhou Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China) (2. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry- Province Jointly Development), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China) (3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: 4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside (MUGal) is specific fluorescent substrate for rapid detection of coliform bacteria which are the important indicator bacteria for food safety. Protected glycoside was produced from condensation of 4-methylumbelliferone (4-MU) and tetraacetyl-α-D-galactopyranosyl bromide under the conditions of phase transfer catalysis, and then deprotection in H₂O/CH₃OH solution of sodium carbonate gave 4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside. Through the study of temperature, time and amount of catalyst on the yield of glycosylation, we found that when the temperature was 30 °C and the reaction time was 16 h, the yield could be up to 73.12%. Yield of alcoholysis reaction with sodium carbonate as base was 91.01%. Structural characterization of target compound was conducted by IR and ¹H NMR. The product was further applied to coliform chromogenic medium. Compared with imported products, they were no significant differences in the number of fluorescent tubes by X² test (P>0.05). In sample test, both positive rate of GB4789.3-2010 (48 h) and MUGal(24 h) were 80%. The detection time was significantly shorter than GB 4789.3-2010. Therefore, the product could be comparable with imported products and could be used as a substitute for imported products.

Key words: 4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside; Phase transfer catalysis; Coliform; Lactose bile ferment broth

收稿日期: 2014-03-21

基金项目: 国家科技型中小企业技术创新基金 (11C26244405503); 广东省教育部产学研结合研究项目 (2011A090200100)

作者简介: 马延霞 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向为大肠菌群显色培养基底物 MUGal 的制备

通讯作者: 吴清平 (1962-), 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事食品微生物安全监测与控制技术研究

大肠菌群是评价食品卫生质量的重要指标之一, 目前已被国内外广泛应用于食品卫生检验工作中。近年来, 国内外关于大肠菌群检测做了大量研究工作。目前, 用于大肠菌群检测的方法主要有多管发酵法、膜过滤法、纸片法、酶底物法等。其中, 酶底物法操作简便, 检测时间短, 但是成本高, 难以推广^[1]。

4-甲基伞形酮基- β -D-吡喃半乳糖苷作为一种荧光底物被广泛应用于生物体内 β -D-半乳糖苷酶的检测。Carmen等^[2]人将其应用于法伯疾病的诊断, Ronald等^[3]人用MUGal检测了哺乳动物细胞提取物中的 β -半乳糖苷酶。特别是近年来, 随着世界各国对食品安全的重视, MUGal还被应用到显色培养基中, 检测水和食物中的大肠菌群^[4,5]。由于大肠菌群代谢过程中产生的 β -半乳糖苷酶会将MUGal分解释放出4-MU, pH为9-10时, 用紫外灯照射会发出很强的蓝色荧光(激发波长365 nm, 发射波长440 nm), 从而可以实现对大肠菌群的检测。应用MUGal检测大肠菌群始于二十世纪七十年代, 后经深入研究, 取得不少成效。美国国家环境保护署于1995年将MUGal为基础成分的MI培养基纳入联邦法规, 做为检测大肠菌群的法定方法之一, 充分说明了这一方法的先进性和可靠性。

国内外关于其合成的文献多是利用Koenigs-Knorr法^[6-7], 催化剂是银盐或者汞盐, 反应过程中, 溴苷易分解, 产率无详细报道, 反应时间长, 需2~3天, 且采用的重金属促进剂会产生大量对环境不友好的废液。朱佳玲^[8]等人将4-甲基伞形酮、氢氧化钾和全乙酰溴代半乳糖加入到N,N-二甲基甲酰胺中反应, 缩短了反应时间, 糖苷化一步反应产率达43%。我们试用了几种常用的酚类糖苷化方法^[9-10], 均未成功或者是产率极低。由于溴苷的酚类糖苷化中, 采用相转移催化(PTC)条件, 溴苷存在于有机相中, 因此可以避免与大量碱液接触, 反应条件温和, 而且产率高^[11]。本文针对Koenigs-Knorr法存在的缺点, 提出用相转移催化法合成MUGal, 糖苷化一步的产率与文献相比明显提高。

1 材料与方法

1.1 试剂

间苯二酚(AR)、乙酰乙酸乙酯(AR)和层析硅胶(200-300目)购自上海晶纯生化科技股份有限公司; β -D-半乳糖五乙酸酯(98%)购自上海岚克医药有限公司; 33%~35% HBr/HOAc 溶液购自上海达瑞精细化学品有限公司; 4-甲基伞形酮- β -D-吡喃半乳糖苷购自 APOLLO 科技有限公司; 胰酪蛋白胨、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、十二烷基硫酸钠、月桂基

硫酸盐胰蛋白胨肉汤(LST)和煌绿乳糖胆盐肉汤(BGLB)购自广东环凯微生物科技有限公司; 其余试剂均为分析纯, 购自广州化学试剂厂。

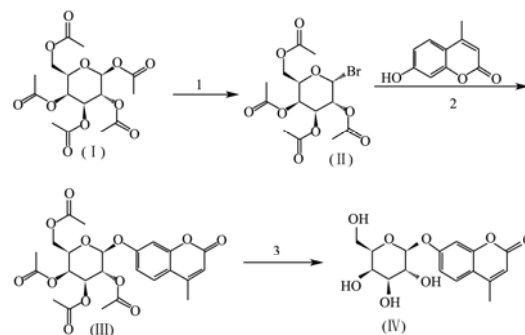
1.2 主要仪器设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Ultimate XB-NH2 (5 μ m \times 4.6 \times 250 mm); 85-2 型恒温磁力搅拌器; Nicolet Magna 760 红外光谱分析仪(KBr压片); Bruker Dpx300 型核磁共振仪; RE-52A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 MUGal 的合成

将间苯二酚加入到乙酰乙酸乙酯中, 加热融化后慢慢滴加到75%的浓硫酸中(低于4 $^{\circ}$ C), 室温下反应12 h后, 将反应液倒入冰水中, 析出固体, 抽滤并用大量冰水洗涤得淡黄色固体。无水乙醇重结晶得4-MU的白色结晶性粉末, 产率74.44%。

向 β -D-半乳糖五乙酸酯(I)中加入33%~35%的HBr/HOAc溶液, 室温下搅拌反应4 h后停止搅拌。将反应液倒入冰水混合物中, 剧烈搅拌, 析出白色固体, 抽滤并用大量冰水洗涤, 二氯甲烷提取, 饱和碳酸氢钠溶液洗涤至中性, 饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥后旋蒸浓缩得无色黏稠状液体, 加入无水乙醚, 放置在冰箱中过夜, 析出白色固体, 抽滤得白色固体, 即四乙酰基- α -D-溴代半乳糖(II), 产率66.47%。



1 33%~35% HBr-HOAc, 4-5h, rt; 2 NaOH, 四丁基溴化铵, 水-三氯甲烷, rt; 3 Na₂CO₃, H₂O-CH₂OH

图1 4-甲基伞形酮基- β -D-吡喃半乳糖苷的合成

Fig.1 Syntheses of 4-methylumbelliferone- β -D-galactoside

注: (I) β -D-半乳糖五乙酸酯; (II) 四乙酰基- α -D-溴代半乳糖; (III) 4-甲基伞形酮基-2,3,4,6-四乙酰基- β -D-吡喃半乳糖苷; (IV) 4-甲基伞形酮基- β -D-吡喃半乳糖苷。

将4-MU和四丁基溴化铵(TBAB)溶于1.25 mol/L的氢氧化钠溶液中, 四乙酰基- α -D-溴代半乳糖(II)溶于三氯甲烷中, 将两种溶液混合, 补加水使水和有机相的体积比为1:1(pH=10.0~10.5), 当pH降至9.0以下时, 补加1.25 mol/L的氢氧化钠溶液。

反应完毕,分出有机层,用 1.25 mol/L 的氢氧化钠洗涤,无水硫酸钠干燥后减压浓缩得棕色黏稠状液体。硅胶柱层析(洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯=1.5:1),得无色透明溶液,浓缩后静置有白色固体析出,真空干燥得白色固体即 4-甲基伞形酮基-2, 3, 4, 6-四乙酰基- β -D-吡喃半乳糖苷(III)。为了提高糖苷化一步的产率,本文对反应温度、反应时间和相转移催化剂用量通过三因素三水平的正交试验进行了优化。

把(III)溶于甲醇中,分别以甲醇钠、碳酸钠、氢氧化钠和 30%氨水为碱,反应后过滤,所得白色固体用冷的甲醇洗涤后乙醇重结晶得 4-甲基伞形酮基- β -D-吡喃半乳糖苷(IV)。合成路线图如图 1 所示。

1.4 结构表征

将最终产物用 Nicolet Magna 760 红外光谱分析仪(KBr 压片)和 Bruker Dpx300 型核磁共振仪进行分析,得到红外谱图和 ^1H NMR 核磁谱图,用 Agilent 1260 高效液相色谱仪分析得高效液相色谱图。

1.5 菌种

大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) ATCC8090、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*) CMCC45103、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC10031、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*) CMCC49027、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) ATCC29212、福氏志贺菌(*Shigella flexneri*) CMCC51572、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC14028 均购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.6 培养基

1.6.1 MUGal 肉汤

称取 20 g 胰酪蛋白胨、5 g 氯化钠、2.75 g 无水磷酸二氢钾、2.75 g 无水磷酸氢二钾、0.1 g 十二烷基硫酸钠以及 MUGal 0.06 g 溶于 1000 mL 水中,加热使溶化,冷却到 50 °C 左右时调节 pH 至 7.1,分装试管,每管 10 mL,116 °C 高压灭菌 10 min。待培养基冷却后,每管培养液内加入 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的头孢磺啶稀释液 0.1 mL。APOLLO 科技有限公司所产的 MUGal 也按相同方法制备肉汤。

1.6.2 对比培养基

月桂基硫酸盐胰蛋白胨肉汤(LST),其具体的配置及使用方法参见 GB/T 4789.3-2010^[12]。

1.7 纯菌检测

将实验用菌种接种于营养肉汤,37 °C 培养 24 h,分别转接两管自制 MUGal 肉汤和两管进口 MUGal 肉汤中,接种后置于 37 °C 下培养 16 h,紫外灯 365 nm 下观察产荧光及生长情况。

1.8 样品检测

从集市上购买猪肉、基围虾、草鱼、凉拌菜、西红柿、饺子、金针菇、鸭肉、黄瓜、冻鸡翅共十份样品。无菌操作下称取 25 g 样品,加入到 225 mL 无菌生理盐水中,以 8000~10000 r/min 均质 1~2 min。按照 MPN 方法再制成十倍递增的稀释样品,选取合适的 3 个稀释度(10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4})接种到本文制备的 MUGal 肉汤、APOLLO 产 MUGal 肉汤和 LST 肉汤,每个稀释度各接种 3 管,每管接种 1 mL,37 \pm 1 °C 下培养 24 h,检查并记录两种 MUGal 肉汤产荧光情况,LST 肉汤产气情况。继续培养至 48 h,观察并记录产荧光和产气情况。将 LST 中所有产气管接种煌绿乳糖胆盐肉汤,37 \pm 1 °C 下培养 48 h,观察产酸产气情况,以产酸产气管为阳性。

2 结果与讨论

2.1 合成条件优化实验

2.1.1 糖苷化一步合成条件的优化

4-MU 和四乙酰基- α -D-溴代半乳糖进行糖苷化生成保护糖苷,是合成糖苷的关键。在单因素实验的基础上,对糖苷化一步影响较大的反应温度、反应时间和相转移催化剂用量三个因素设计了三因素三水平的正交试验,以糖苷化一步产率为评价指标比较了实验中三个因素极差的大小得到最佳反应条件。因素与水平的选择见表 1,正交试验结果见表 2。

表 1 正交试验各因素水平的选择

水平	影响因素		
	A(温度/ $^{\circ}\text{C}$)	B(时间/h)	C(相转移催化剂加入量/mol %)
1	15	12	40
2	30	16	60
3	40	24	80

由表 2 中 R 值可知,各因素对糖苷化一步产率的影响大小顺序为 A>C>B,即温度影响最大,相转移催化剂用量次之,时间影响最小,最佳组合为 A₂B₂C₃。通过正交试验确定糖苷化一步反应最佳条件为:催化剂用量为 80%,于 30 °C 下反应 16 h,糖苷化一步产率最高达 73.12%。

表2 正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal test

试验号	A	B	C	收率/%
1	1	1	1	40.97
2	1	2	2	52.13
3	1	3	3	67.91
4	2	1	2	63.77
5	2	2	3	73.12
6	2	3	1	65.18
7	3	1	3	62.82
8	3	2	1	57.13
9	3	3	2	60.35
K ₁	53.63	55.80	54.37	
K ₂	67.30	60.77	58.70	
K ₃	60.07	64.43	67.93	
R	13.67	8.63	13.57	
主次次序	A>C>B			
优水平	A ₂	B ₂	C ₃	
最优组合	A ₂ B ₂ C ₃			

2.1.2 不同碱对醇解反应的影响

由(III)到(IV)去保护一步,不同的碱对其产率的影响较大。考察了不同碱对醇解反应一步产率的影响,结果见表3。由表3可知碳酸钠为碱时产率最高,达91.01%。不同的碱反应完全的时间也有较大差异,甲醇钠为碱时,所用时间最短,但产率不是最高的。综合考虑,碳酸钠为碱较合适。

表3 碱和反应时间对醇解反应的影响

Table 3 Effect of base and reaction time on the alcoholysis

序号	碱	反应时间/h	温度/°C	收率/%
1	甲醇钠	0.25	15	79.82
2	碳酸钠	0.50	15	91.01
3	氢氧化钠	0.25	15	69.57
4	30%氨水	8.00	15	85.16

2.2 产物结构表征

从红外光谱上来看,糖环 C1-H 的弯曲震动常用来判断糖苷键的类型。 β -型异构体的 C1-H 的弯曲震动吸收在 890 cm^{-1} 处出峰,产物在 891.6 cm^{-1} 处有吸收峰,可初步判断产物为 β 构型;从 $^1\text{H NMR}$ 来看,糖环 C1-H 的耦合常数为 7.5 Hz ,根据 $J_{1a-2a}=7\sim 10\text{ Hz}$, $J_{1e-2a}=2.5\sim 3.5\text{ Hz}$ [13] 的规律,可断定产物为 β 构型。图2、图3分别为4-甲基伞形酮基- β -D-吡喃半乳糖苷的 IR 谱图和 $^1\text{H NMR}$ 谱图。IR (KBr), ν , cm^{-1} : 3452,

1068, 1029, 891.6。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.70(d, $J=8.7\text{ Hz}$, 1H, H-5), 7.03(d, $J=7.5\text{ Hz}$, 2H, H-8, 6), 6.25(s, 1H, H-3), 5.26(d, $J=4.9\text{ Hz}$, 1H, H-OH), 4.99(d, $J=7.5\text{ Hz}$, 1H, H-1'), 4.93(d, $J=5.7\text{ Hz}$, 1H, H-OH), 4.69(t, $J=5.1\text{ Hz}$, 1H, H-OH), 4.56(d, $J=4.2\text{ Hz}$, 1H, H-OH), 3.70-3.45(m, 6H, H-2', 3', 4', 5', 6'), 2.40(s, 3H, CH_3)。

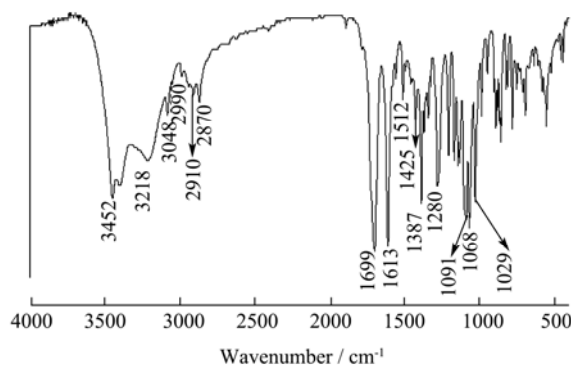


图2 4-甲基伞形酮基- β -D-吡喃半乳糖苷 IR 谱图

Fig.2 The IR spectrum of 4-methylumbelliferone- β -

D-galactoside

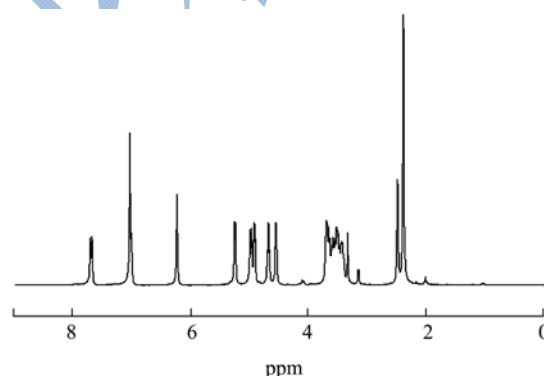


图3 4-甲基伞形酮基- β -D-吡喃半乳糖苷 $^1\text{H NMR}$ 谱图

Fig.3 The $^1\text{H NMR}$ spectrum of 4-methylumbelliferone- β -

D-galactoside

对产物进行 HPLC 分析,结果如图4所示。由图4可见,制备 MUGal (b) 的 HPLC 谱图与标准品 (a) 的 HPLC 谱图特征吻合。在保留时间为 9.03 min 附近,样品与标准品均出现一个响应强烈的特征峰,结合数据分析,此峰为 MUGal 的特征峰。HPLC 分析得到制备 MUGal 的纯度为 99.10%,高于 APOLLO 产 MUGal (98.71%)。

2.3 标准菌株及实际样本检验结果

2.3.1 纯菌检测

分别采用进口底物 (APOLLO) 和自制底物配制培养基,并接种标准菌株后在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 16 h,实验结果见表4。由表4可知各菌株在本文制备的 MUGal 配成的培养基和采用 APOLLO 产的 MUGal

配成的肉汤中的产荧光情况是一致的,即大肠埃希氏菌、弗氏柠檬酸杆菌、产气肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌在两种肉汤中都产荧光,粪链球菌、鼠伤寒沙门氏菌、普通变形杆菌和福氏志贺菌不产荧光。

著性差异。

表4 相关肠道菌在自制MUGal和APOLLO产MUGal制备的培养基中产荧光的比较

Table 4 Comparison of fluorescence produced by related intestinal bacteria in the medium of selfmade and APOLLO

		MUGal	
序号	菌种	自制 MUGal	APOLLO 产 MUGal
1	大肠埃希菌 (ATCC25922)	+	+
2	弗氏柠檬酸杆菌 (ATCC8090)	+	+
3	产气肠杆菌 (CMCC45103)	+	+
4	肺炎克雷伯氏菌 (ATCC10031)	+	+
5	粪链球菌 (ATCC29212)	-	-
6	鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC14028)	-	-
7	普通变形杆菌 (CMCC49027)	-	-
8	福氏志贺菌 (CMCC51572)	-	-

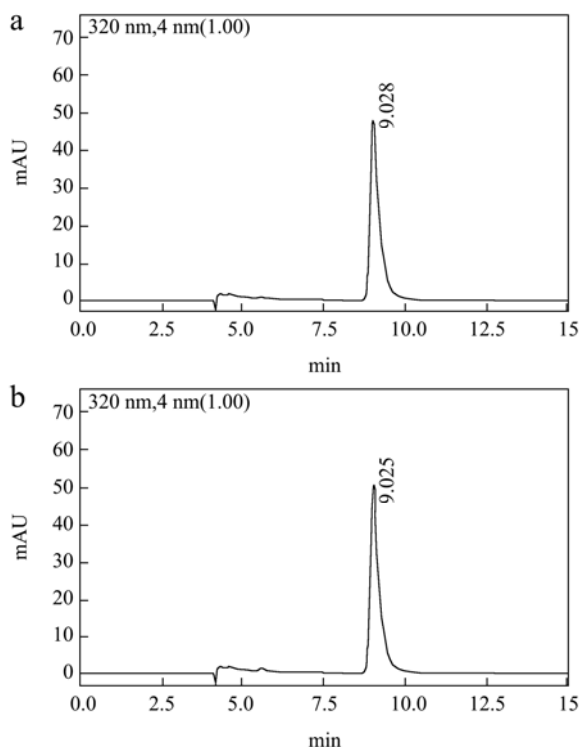


图4 制备产物和MUGal标准品的HPLC对照

Fig.4 HPLC comparison between the MUGal of prepared and standard

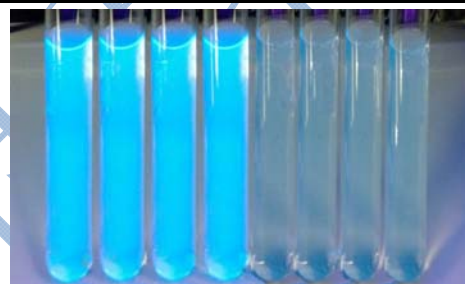


图5 阳性(蓝色荧光管)和阴性(无荧光管)对照图

Fig.5 The comparison of positive tubes (the tubes emit blue fluorescence) and negative tubes (the tubes without fluorescence)

2.3.2 样品检测

用本文制备的MUGal肉汤和APOLLO产MUGal肉汤以MPN法检测肉制品、速冻食品 and 新鲜蔬菜等十份样品。检测结果见表5,经 X^2 检验分析,本文制备的MUGal肉汤和APOLLO产MUGal肉汤产荧光管数无显

注:图中从左至右:大肠埃希菌ATCC25922;弗氏柠檬酸杆菌ATCC8090;产气肠杆菌CMCC45103;肺炎克雷伯氏菌ATCC10031;粪链球菌ATCC29212;鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028;普通变形杆菌CMCC49027;福氏志贺菌CMCC51572。

表5 自制MUGal和APOLLO产MUGal检验样品结果比较

Table 5 Comparison of sample test with MUGal from selfmade and APOLLO

稀释倍数	管数	自制 MUGal	APOLLO 产 MUGal	合计	符合率/%	$(X^{2(1)}_{0.05}=3.84)$	
						X^2	P
10^{-1}	阳性	24	24	48	100	0.00	$1.00 > 0.05$
	阴性	6	6	12			
	合计	30	30	60			
10^{-2}	阳性	22	21	43	1.05	0.08	$0.77 > 0.05$
	阴性	8	9	17			
	合计	30	30	60			
10^{-3}	阳性	13	13	26	100	0.00	$1.00 > 0.05$
	阴性	17	17	34			
	合计	30	30	60			

从表6可以看出,培养24h时,国标方法(GB 4789.3-2010)检出6份阳性样品,MUGal肉汤检出了

8份阳性样品。继续培养至48h,国标方法检出8份样品为大肠菌群阳性,检出率为80%,与用两种

MUGal 肉汤检测的结果一致,说明 MUGal 肉汤的检出速度要比国标方法快。另外,由表 7 可知培养 24 h 时,用 MUGal 肉汤得到的大肠菌群 MPN 值有 6 份样品均大于国标方法。只有一份样品(基围虾)采用 APOLLO 产的 MUGal 制备的肉汤检测得到的大肠菌

群 MPN 值小于国标方法得到的 MPN 值。因此自制 MUGal 的检测结果略优于进口产品。当培养至 48 h 时,国标方法的 MPN 值接近培养 24 h 的 MUGal 方法。

表 6 样品中大肠菌群检测阳性样本数比较

Table 6 Comparison of the positive samples in sample test of coliform-detection

序号	品名	自制 MUGal 阳性管数		APOLLO 产 MUGal 阳性管数		GB 4789.3-2010	
		24 h	48 h	24 h	48h	24 h	48 h
1	猪肉	3-3-1	3-3-3	3-2-1	3-3-2	2-1-0	3-3-3
2	基围虾	3-3-3	3-3-3	3-3-1	3-3-3	3-3-2	3-3-3
3	草鱼	3-2-0	3-3-3	3-2-0	3-3-2	2-1-0	3-3-1
4	凉拌菜	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
5	西红柿	3-3-2	3-3-2	3-3-2	3-3-2	0-0-0	1-0-0
6	饺子	3-3-3	3-3-3	3-2-1	3-2-2	0-0-0	2-1-0
7	金针菇	3-3-2	3-3-3	3-3-3	3-3-3	3-3-3	3-3-3
8	冻鸡翅	3-3-3	3-3-3	3-3-3	3-3-3	3-2-1	3-3-3
9	鸭肉	3-2-1	3-3-3	3-3-2	3-3-3	2-0-0	3-0-0
10	黄瓜	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
阳性样本数(个)		8	8	8	8	6	8

注: 3-3-3表示 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 三个稀释度下阳性管数分别为3、3、3, 2-1-0表示 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 三个稀释度下阳性管数分别为2、1、0, 以此类推。

表 7 样品中大肠菌群 MPN 法检测结果比较

Table 7 Comparison of MPN in sample test of coliform-detection

序号	品名	自制 MUGal	APOLLO 产 MUGal	GB 4789.3-2010	
		(24 h)	(24 h)	24 h	48 h
1	猪肉	1500	1500	150	> 11000
2	基围虾	> 11000	4600	11000	> 11000
3	草鱼	2300	2300	150	4600
4	凉拌菜	< 30	< 30	< 30	< 30
5	西红柿	210	150	< 30	36
6	饺子	> 11000	280	< 30	150
7	金针菇	> 11000	11000	> 11000	> 11000
8	冻鸡翅	> 11000	> 11000	1500	> 11000
9	鸭肉	> 11000	11000	92	230
10	黄瓜	< 30	< 30	< 30	< 30

3 结论

本文在相转移催化条件下合成了 4-甲基伞形酮基- β -D-吡喃半乳糖苷,并得出最优反应条件: pH 在 10.0~10.5 之间,反应温度为 30 °C 时反应 16 小时,糖苷化一步产率可达 73.12%,醇解反应一步以碳酸钠为碱收率可达 91.01%,糖苷化一步产率与文献的 43% 相比有了明显提高,且反应条件温和,降低了制备成本。将合成的 MUGal 应用于显色培养基,实验菌株在

本文制备的 MUGal 配成的培养基和采用 APOLLO 所产的 MUGal 配成的培养基上的产荧光情况一致;将制备底物和 APOLLO 产底物应用于实际样本检测,经 X^2 检验,无显著性差异;且 MUGal 肉汤和国标方法相比,检出速度快,有效缩短了检测时间。本文制备的 MUGal 纯度高于进口产品,可以作为进口产品的替代品。

参考文献

- [1] 陈灿映.大肠菌群快速检测培养基的研制及评价[D].郑州:郑州大学,2012
CHEN Can-ying. Establishment and evaluation of cultural medium for rapid detection of coliform in food samples [D]. Zhengzhou:Zhengzhou University, 2012
- [2] Bedia C, Camacho L, Abad J L, et al. A simple fluorogenic method for determination of acid ceramidase activity and diagnosis of Farber disease [J]. Journal of Lipid Research, 2010, 51, 3542-3547
- [3] Ronald K G, Susan M K. Quantitative assay of senescence-associated β -galactosidase activity in mammalian cell extracts [J]. Anal Biochem, 2005, 343(2): 329-334
- [4] 李平,甄宏太,方原民,等.应用4-甲基伞形酮- β -D-半乳糖苷快速检测食品中的大肠菌群[J].食品科学,2007,28(4):285-288
LI Ping, ZHEN Hong-tai, FANG Yuan-min, et al. Rapid determination of coliforms in foods with 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside [J]. Food Science, 2007, 28(4): 285-288
- [5] Orenga S, James A L. Enzymatic substrates in microbiology [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79, 139-155
- [6] Perry J D, James A L, Morris K A, et al. Evaluation of novel fluorogenic substrates for the detection of glycosidases in *Escherichia coli* and *enterococci* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101, 977-985
- [7] Stephen Reed.Synthesis and characterisation of novel glycosidase substrates and evaluation of applications in biomedical science [D]. Newcastle:Northumbria University, 2009
- [8] 朱佳玲,董纪昌,杨志玲.酶-底物快速检测试剂Mugal的合成及应用[J].化学试剂,1997,19(4):210-212
ZU Jia-ling, DONG Ji-chang, YANG Zhi-ling. Synthesis and application of Mugal, an enzyme-substrate rapid determination reagent [J]. Chemical Reagents, 1997, 19(4): 210-212
- [9] Anna K B, Sandra S F, John F T. Structurally diverse disaccharide analogs of antifreeze glycoproteins and their ability to inhibit ice recrystallization [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(4): 1719-1721
- [10] 许庆兵,盛超,刘媛媛,等.7-羟基-4-(β -D-吡喃葡萄糖苷基)葛根素的合成[J].精细化工,2010,27(12):1197-1200
XU Qing-bing, SHENG Chao, LIU Yuan-yuan, et al. Synthesis and characterization of 7-hydroxy-4-(β -D-glucopyranosyloxy) puerarin derivatives [J]. Fine Chemicals, 2010, 27(12): 1197-1200
- [11] Kajjout M, Zemmouri R, Rolando C. An expeditious synthesis of quercetin 3-O- β -D-glucuronide from rutin [J]. Tetrahedron Letters, 2011, 52(37): 4738-4740
- [12] GB 4789.3-2010 食品卫生微生物学检验 大肠菌群计数[S]
GB 4789.3-2010 Food microbiological examination-Enumeration of coliforms [S]
- [13] 臧洪俊,李正名.水杨酸类糖酯化合物的合成及其生物活性[J].高等学校化学学报,2006,7(10):1877-1880
ZANG Hong-jun, LI Zheng-ming. Synthesis and bioactivity of salicylic acid saccharide carboxylate [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2006, 7(10): 1877-1880