

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2014.09.032

酸水解对 DNS 法测定甜高粱中总糖的影响分析*

张成明^{1,2} 姜立^{1,2} 李十中^{1,2}

(1. 清华大学核能与新能源技术研究院, 北京 100084; 2. 北京市生物燃料工程技术研究中心, 北京 100084)

摘要: 分析了酸水解对 DNS 法(3,5-dinitrosalicylic acid method)测定甜高粱中总糖产生影响的原因。通过对甜高粱浸提液水解后的糖组分检测发现:6 mol/L 盐酸与糖液按体积比 2:1 混合,沸水浴 30 min 会造成果糖完全分解。在这种条件下,利用 DNS 法测定葡萄糖、果糖和蔗糖时,测量值分别为理论值的 100%、2.5% 和 52.2%。同时,果糖水解后的溶液会在高压液相图谱上出现葡萄糖伪峰,造成葡萄糖测定值偏高。酸浓度、水解时间以及水解温度均会对果糖与蔗糖的测定产生影响。实验结果表明:果糖在酸水解过程中发生分解是造成 DNS 法测定甜高粱中总糖产生误差的原因。采用 DNS 法测定含有果糖与蔗糖的原料总糖时,需要在保证蔗糖完全水解的情况下果糖不被破坏,否则会造成测定的不准确。

关键词: 甜高粱 总糖 3,5-二硝基水杨酸 酸水解 果糖 蔗糖

中图分类号: TK6; Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)09-0199-05

引言

随着化石资源日益枯竭以及人们对环境问题的日益重视,清洁的可再生能源在世界范围内引起了广泛关注。2012 年全球生物燃料产量 9 420 万 t,销售额 952 亿美元,其中,燃料乙醇占 80% 以上^[1]。在燃料乙醇生产中,原料成本是主要生产成本^[2],原料利用率在乙醇生产过程中至关重要,这就要求原料中可发酵成分的检测方法具有高度的准确性。目前,我国生产燃料乙醇的原料主要有淀粉质原料(如木薯、玉米、小麦等)和糖质原料(如甘蔗、甜菜等),其原料成分分析方法均已建立,并制定了相应的国家标准或行业标准^[3-7]。甜高粱作为一种新兴且极具工业应用前景的糖质原料,其糖分测定的标准方法仍未建立。

甜高粱中糖分包括蔗糖、葡萄糖和果糖,其比例会随着甜高粱生长或存储时间的变化而变化。甜高粱糖分测定包括还原糖和总糖测定,测定方法主要包括 HPLC 法和 DNS 法。其中,HPLC 法是基于液相色谱的一种分离物质和测定物质浓度的方法,具有测定结果准确的优点,可以直接测定原料中的各种糖组分。但是该方法设备费用高、测样周期长(每个样本约 30 min),不适合快速、大批量的样品测定。DNS 法是测定还原糖的经典方法,得到国内

外研究者的普遍认可,具有测试周期短,设备要求简单的特点,可以进行大批量测定。但是,该方法仅可以直接测定原料中的还原糖(葡萄糖和果糖),在测定总糖时,需要对原料进行酸水解后再进行测定。但是,不同文献报道的酸水解条件差异较大^[8-12]。实验发现,样品经酸水解后,再通过 DNS 法或 HPLC 法测定总糖时,经常会出现一些偏差。酸水解过程极有可能是造成测定结果出现偏差的原因,本文对酸水解过程影响测定结果的原因进行分析,以期对甜高粱糖分标准检测方法的建立提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与仪器

无水葡萄糖(AR,西陇化工股份有限公司)、D-果糖(Amresco; High Purity Grade; 纯度 99.0% 以上)、蔗糖(Amresco; High Purity Grade; 纯度 99.0% 以上)、紫外分光光度计、高效液相色谱(HPLC,日本岛津),浓盐酸(北京化工),氢氧化钠(AR,国药集团有限公司)。

6 mol/L 盐酸配置:浓盐酸与去离子水等体积混合,用于文中的酸水解实验。

1.2 实验方法

1.2.1 还原糖质量浓度测定

根据 DNS 法^[13]测定。

收稿日期:2013-11-17 修回日期:2013-12-14

* 科技部国际合作计划资助项目(2012DFG61720、2012DFG61700)和“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2011BAD22B03)

作者简介:张成明,博士后,助理研究员,主要从事生物燃料研究,E-mail: cmzhang@tsinghua.edu.cn

通讯作者:李十中,教授,主要从事生物燃料与化工研究,E-mail: szli@tsinghua.edu.cn

1.2.2 HPLC 色谱条件

示差折光检测器,HPX-87H 离子交换柱,柱温 40℃,流动相 0.005 mL/L 稀硫酸(超声波脱气,并经 0.45 μm 滤膜过滤),流速 0.5 mL/min,进样量 100 μL。

1.2.3 糖标准溶液的配制

将无水葡萄糖与蔗糖在 105℃ 的干燥箱中干燥至恒质量,果糖在 85℃ 条件下干燥至恒质量,在四位天平上准确称取一定质量,用去离子水配置成糖单标溶液,使葡萄糖、果糖、蔗糖的质量浓度均为 4.000 g/L。

1.2.4 甜高粱糖液的制备

粉碎后的甜高粱秆 60℃ 水浴浸提 3 次过滤,收集浸提液,备用。

1.2.5 酸水解条件

实验中酸水解条件设置见表 1。酸水解后,经冷却,用 2 mol/L 的 NaOH 溶液中和,稀释一定倍数,待测,每组做 3 个平行实验。

表 1 酸水解条件

Tab.1 Acid hydrolysis conditions

条件序号	糖液与酸液体积比	酸水解温度/℃	酸水解时间/min
1	1:2	100	30
2	1:0.1, 1:0.5, 1:1.5, 1:2.0	100	30
3	1:2	100	0.5、10、15、20、25、30
4	1:2	60、70、80、90、100	30

1.2.6 蔗糖水解率与果糖降解率的测量方法

蔗糖水解后,用 DNS 法测定其还原糖质量浓度,HPLC 测定果糖质量浓度,两者差值(即蔗糖水解液中的葡萄糖质量浓度)乘以 1.9 除以蔗糖的配置浓度再乘以 100% 即为蔗糖水解率。

果糖水解释后,DNS 法测定溶液还原糖质量浓度,用果糖配置浓度减去该值,然后除以果糖配置浓度即为果糖降解率。

2 结果与讨论

2.1 酸水解对甜高粱糖含量测定的影响

分别采用 DNS 法与 HPLC 法对甜高粱糖液在酸水解(表 1,酸水解条件 1)前后的糖分进行检测,结果如图 1 所示。

酸水解前,DNS 法测量值略低于 HPLC 测量值,与 HPLC 法测定的葡萄糖和果糖的总量一致。这是因为 DNS 法只能测定还原糖(葡萄糖、果糖)而无法测定非还原糖(蔗糖)。酸水解后,DNS 法与 HPLC

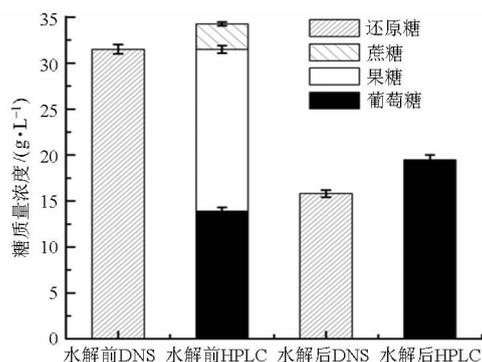


图 1 酸水解前后 DNS 法与 HPLC 法测定甜高粱糖液中的含糖量

Fig. 1 Sugar contents in sweet sorghum juice determined by DNS and HPLC methods before and after acid hydrolysis

法测量结果相近,但均显著小于酸水解前的测量值,分别为各自酸水解前测量值的 50.16% 和 56.69%。此外,HPLC 结果显示,经酸水解后,蔗糖、果糖消失,葡萄糖含量有所增加。根据理论计算(1 分子蔗糖水解为 1 分子葡萄糖和 1 分子果糖),糖液经酸水解后应该获得 15.35、19.05 g/L 的葡萄糖和果糖。但实验中未检测到果糖的存在,同时测得的葡萄糖质量浓度(17.45 g/L)比理论值高 13.68%。显然,无论对于 DNS 法或者 HPLC 法,酸水解过程对糖含量测定产生了极大影响。下文分别以蔗糖、葡萄糖、果糖为实验对象,并分别利用 DNS 法和 HPLC 法对糖含量和组分进行检测,以分析酸水解后总糖测定结果偏低、果糖消失和葡萄糖含量超过理论值的原因。

2.2 酸水解对葡萄糖、果糖、蔗糖测定的影响

酸水解条件同 2.1 节。水解后,分别利用 DNS 法和 HPLC 法对水解后样品中的糖含量及糖分组成进行分析,结果如图 2 所示。图 2 表明,酸水解后,葡萄糖、果糖和蔗糖的测量值(DNS 法)分别为理论值的 100%、2.5% 和 52.2%。

果糖水解释后 DNS 测量值为理论值的 2.5%,表明果糖基本被完全水解,且水解后的物质基本不具有还原性。果糖水解释后的 HPLC 结果也证实了果糖的水解(图 3)。但是,HPLC 结果显示,果糖水解释后的溶液中有葡萄糖生成(图 3),其含量相当于果糖理论值的 25.74%(图 2)。结合水解溶液基本不具有还原性的结果(DNS 结果),说明 HPLC 图谱上出现的葡萄糖峰是一个伪峰。而将果糖水解释产物之一误判为葡萄糖,也是造成 2.1 节中葡萄糖测量值(HPLC 法)高于理论值的原因。

蔗糖水解后 DNS 测量值为理论值(理论生成葡萄糖与果糖总量)的 52.2%。结合 HPLC 结果(溶液中只含有葡萄糖,图 2、图 3)及果糖水解释实验结

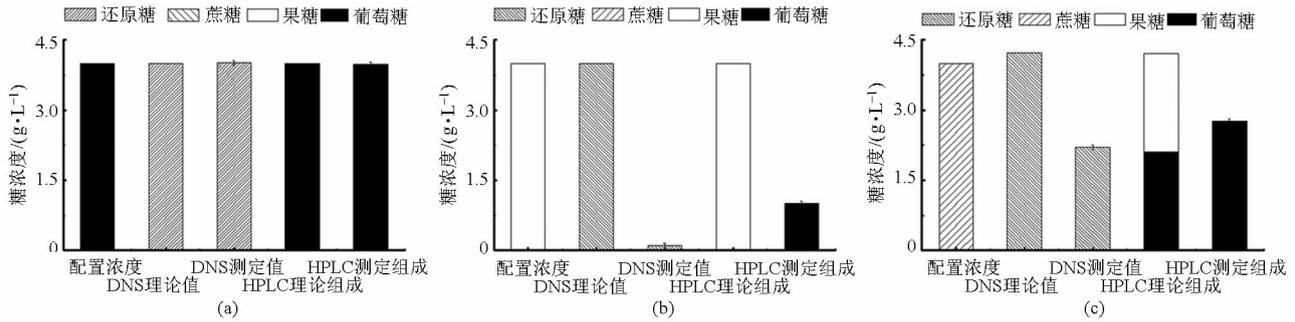


图 2 葡萄糖、果糖和蔗糖酸水解后 DNS 与 HPLC 检测结果

Fig. 2 Measurement results of glucose, fructose and sucrose by DNS and HPLC methods after acid hydrolysis

(a) 葡萄糖 (b) 果糖 (c) 蔗糖

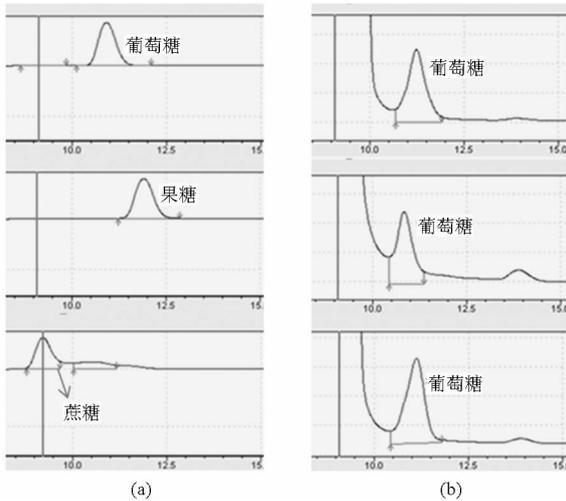


图 3 葡萄糖、果糖和蔗糖水解前后的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC maps of glucose, fructose and sucrose

before and after acid hydrolysis

(a) 酸水解前 (b) 酸水解后

果,此现象产生的原因是蔗糖水解后,果糖发生了进一步水解。同时,HPLC 结果显示,水解后生成的葡萄糖量为理论值的 131.6%,与 2.1 节中实验现象类似。根据果糖酸水解为 25.74% 葡萄糖进行折算,则蔗糖酸水解后,HPLC 测得的葡萄糖含量应为理论值的 125.7%,与实验结果基本吻合,说明此时蔗糖已经完全水解,且蔗糖水解后,果糖又进一步酸水解完全。

根据以上结果以及 2.1 节中甜高粱中不同糖组分的含量进行计算,则水解后 DNS 与 HPLC 的测量值应分别为水解前的 50.23% 和 58.87%,这与实际测得的数据(50.16% 和 56.69%)基本吻合,说明甜高粱糖液在酸水解过程中发生了相同的反应。

以上结果表明,果糖在酸水解过程中的进一步水解是造成 DNS 法测定总糖产生误差的原因。为了进一步确认果糖的水解,特进行以下实验。

2.3 果糖水解释现象的确认

酸水解条件:果糖溶液与 6 mol/L 盐酸体积比分别为 1:0、1:0.5、1:1、1:1.5、1:2,沸水浴 30 min。

结果表明,随着盐酸浓度的增加,果糖水溶液的颜色逐渐加深(图 4)。产生此种现象的原因可能是加热条件下盐酸加速了“焦糖化”反应^[14]。利用 HPLC 对果糖酸水解后的溶液进行检测发现,随着盐酸浓度的增大,酸水解后糖液中的果糖逐渐减少最后消失,而葡萄糖对应的保留时间处峰面积在逐渐增大。此外,HPLC 上还有 3 个新的峰出现,如图 5 所示,这表明酸水解后,果糖生成了 4 种或多种



图 4 不同浓度盐酸水解后果糖溶液颜色对比

Fig. 4 Color contrast of fructose solutions after acid hydrolysis with different concentrations of hydrochloric acid

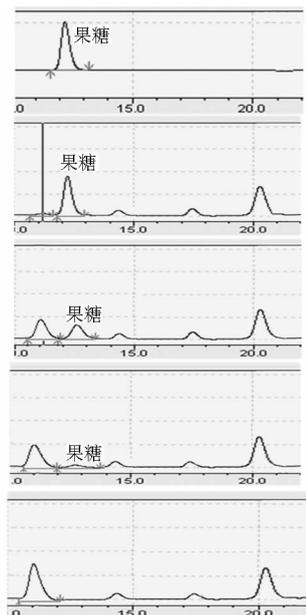


图 5 不同酸浓度水解后果糖溶液的 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC maps of fructose solutions after acid hydrolysis with different concentrations of hydrochloric acid

新的物质。图中由上到下体积比依次为 1:0、1:0.5、1:1、1:1.5、1:2,水解时间 30 min。

Yomán-Leshkov 等^[15]曾在 179℃ 条件下用 0.25 mol/L 盐酸水解果糖,发现果糖会转化为 5-羟基糠醛、乙酰丙酸、甲酸、胡敏素等物质。虽然水解温度较低,但是酸浓度相对较高,也有可能发生上述反应,造成果糖脱水以及新物质的生成。

2.4 酸水解条件对蔗糖水解和果糖降解的影响

根据以上实验结果,在利用 DNS 法测定甜高粱中总糖时,酸水解时既要保证蔗糖 100% 水解,还要避免果糖在酸水解过程中被降解。以下实验考察了文献中常见酸水解条件对蔗糖水解及果糖降解的影响。

2.4.1 酸浓度对蔗糖水解和果糖降解的影响

酸水解条件同 2.3 节。随着酸浓度增加,蔗糖水解率和果糖降解率在不断上升(图 6)。当蔗糖与酸溶液体积比为 1:0.5 时,蔗糖水解率已经达到 100%,但此时果糖已发生大幅降解,降解率约为 60%。结果表明,在沸水浴 30 min 的水解条件下,糖液与酸溶液体积比 1:0.5 时,即可造成果糖的显著破坏,因此,在此水解温度和时间的条件下,应选择更低的酸浓度。

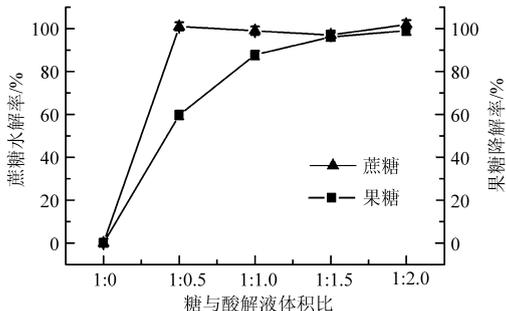


图 6 盐酸浓度对蔗糖水解率和果糖降解率的影响

Fig. 6 Effect of hydrochloric acid concentrations on hydrolysis rate of sucrose and degradation rate of fructose

2.4.2 酸水解时间对蔗糖水解和果糖降解的影响

酸水解条件:糖液与酸液体积比为 1:2,沸水浴,水解时间分别为 5、10、15、20、25、30 min。

如图 7 所示,蔗糖水解率和果糖降解率随着时间的延长而增大。水解时间为 5 min 时,蔗糖已完全水解。此时,果糖降解率为 38%。而且,在 0~15 min 内,果糖降解率近似呈线性增加。根据 HPLC 结果(结果未列),在此酸解条件下,蔗糖水解与果糖降解几乎同时发生,两者之间不存在滞后。所以,在本实验条件下,不能单纯通过缩短水解时间而同时达到促进蔗糖水解与保护果糖不受破坏的目的。

2.4.3 酸水解温度对蔗糖水解和果糖降解的影响

酸水解条件:糖液与酸解液比例为 1:2,水解时

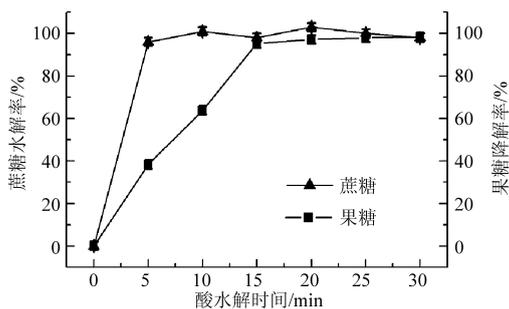


图 7 酸水解时间对蔗糖水解率和果糖降解率的影响

Fig. 7 Effect of acid hydrolysis time on hydrolysis rate of sucrose and degradation rate of fructose

间 30 min,水解温度 60、70、80、90、100℃。

在所有实验温度下,蔗糖的水解率均可以达到 100%,而果糖的降解率随着水解温度的升高而增加(图 8)。值得注意的是,当水解温度为 60 及 70℃ 时,获得了所有实验条件下最低的果糖降解率(9.01% 和 10.18%)。当水解温度超过 70℃ 时,果糖降解率则显著上升。这说明,在确定最佳水解条件时,应尽量选择 70℃ 以下的水解温度。

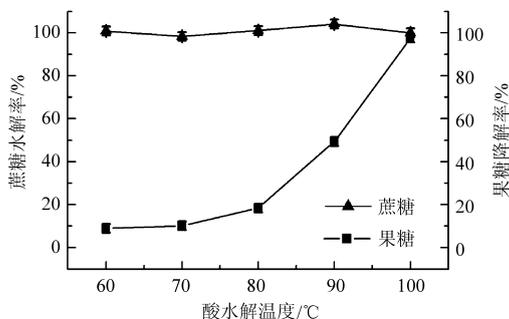


图 8 酸水解温度对蔗糖水解率和果糖降解率的影响

Fig. 8 Effect of acid hydrolysis temperature on hydrolysis rate of sucrose and degradation rate of fructose

总体来说,在相同的酸水解条件下,蔗糖水解比果糖降解更容易发生。这意味着可以确定一种水解条件,既可以保证蔗糖的完全水解,又可以避免果糖的降解,进而建立甜高粱糖分检测的标准方法。此外,本文的结果对于酸水解后利用 DNS 法测定含有蔗糖(或蔗糖和果糖)物料的总糖时,具有重要的借鉴意义。需要说明的是,本文重点在于解释酸水解条件对 DNS 法测定产生影响的原因,以及对现有文献中的酸水解条件进行简单的评估,尚未能确立一种比较准确的、可以用于定量检测的酸水解条件。根据本文的结果,在建立酸水解条件时,需要以蔗糖、果糖回收率为考察值,综合考量底物糖浓度、水解温度、水解时间以及酸浓度对糖分测定的影响。

3 结论

(1) 果糖在剧烈酸水解条件下的降解是造成 DNS 法测定甜高粱总糖产生误差的原因。

(2)在实验 HPLC 条件下,果糖降解后的产物会在葡萄糖保留时间处出峰,这会造成 HPLC 检测葡萄糖含量时结果偏高。

果糖均有不同程度的损失。果糖的损失程度随着酸浓度增加、水解时间延长以及水解温度升高而增大。

(4)在建立酸水解条件时,应尽量选择较低的酸浓度及水解温度。

(3)酸水解条件下,均可以使蔗糖完全水解,但是,

参 考 文 献

- 1 Pernick R, Wilder C, Winnie T. Clean energy trends 2013[R]. Clean Edge, Inc., 2013.
- 2 Zi L H, Liu C G, Xin C B, et al. Stillage backset and its impact on ethanol fermentation by the flocculating yeast[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(5-6): 753-758.
- 3 GB/T 5513—2008 粮油检验 粮食中还原糖和非还原糖测定[S]. 2008.
- 4 GB/T 5514—2008 粮油检验 粮食、油料中淀粉含量测定[S]. 2008.
- 5 GB/T 25219—2010 粮油检验 玉米淀粉含量测定 近红外法[S]. 2010.
- 6 GB/T 10499—2010 糖料甘蔗[S]. 2010.
- 7 NY/T 1751—2009 甜菜还原糖的测定[S]. 2009.
- 8 王俊刚,张树珍,杨本鹏,等. 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定甘蔗茎节总糖和还原糖含量[J]. 甘蔗糖业, 2008(5): 45-49. Wang Jungang, Zhang Shuzhen, Yang Benpeng, et al. Application of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method to test the reducing sugar and water-soluble total sugar content in sugarcane internodes[J]. Sugarcane and Cane sugar, 2008(5): 45-49. (in Chinese)
- 9 耿欣,李天成,李十中,等. 甜高粱茎秆固态发酵制取燃料乙醇过程分析与中试研究[J]. 太阳能学报, 2010, 31(2): 257-262. Gen Xin, Li Tiancheng, Li Shizhong, et al. Study on the process parameters of solid state fermentation for fuel ethanol production from sweet sorghum stalks and pilot test[J]. Acta Energetica Solaris Sinica, 2010, 31(2): 257-262. (in Chinese)
- 10 Li S Z, Li G M, Zhang L, et al. A demonstration study of ethanol production from sweet sorghum stems with advanced solid state fermentation technology[J]. Applied Energy, 2013, 102: 260-265.
- 11 Liu Q L, Wang S L, Zhi J F, et al. Efficient production of lactic acid from sweet sorghum juice by a newly isolated lactobacillus salivarius CGMCC 7.75[J]. Indian Journal of Microbiology, 2013, 53(3): 332-336.
- 12 GB/T 5009.8—2008 食品中蔗糖的测定[S]. 2008.
- 13 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- 14 贾玉平. 水解条件对食品总糖测定的影响[J]. 大众标准化, 2007(2): 81-82. Jia Pingyu. Effect of hydrolysis conditions on determining total sugar in food[J]. Popular Standardization, 2007(2): 81-82. (in Chinese)
- 15 Román-Leshkov Y, Chheda J N, Dumesic J A. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose[J]. Science, 2006, 312: 1933-1937.

Influence of Acid Hydrolysis on Total Sugar Determination in Sweet Sorghum by DNS Method

Zhang Chengming^{1,2} Jiang Li^{1,2} Li Shizhong^{1,2}

(1. Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2. Beijing Engineering Research Center of Biofuels, Beijing 100084, China)

Abstract: The reason of the influence of acid hydrolysis on total sugar determination in sweet sorghum by 3,5-dinitrosalicylic acid method was analyzed. Fructose could completely degrade when the ratio of 6 mol/L hydrochloric acid to sugar liquid was 2:1 in a boiling water bath for 30 min. Under such conditions, the measured values of glucose, fructose and sucrose by DNS method were 100%, 2.5% and 52.2% of the corresponding theoretical values. Meanwhile, the fructose solution after hydrolysis appeared a pseudo-peak of glucose in the HPLC chromatogram, which caused glucose value higher than the real value. The determination of fructose and sucrose was impacted by the acid concentration, hydrolysis time and hydrolysis temperature. Fructose degradation during the acid hydrolysis caused the measurement error in the total sugar determination in sweet sorghum by DNS method. When determine total sugar content in raw material contained fructose and sucrose by DNS method, it should ensure the complete hydrolysis of sucrose, and no degradation of fructose, otherwise it would result in inaccurate measurement.

Key words: Sweet sorghum Total sugar 3,5-dinitrosalicylic acid Acid hydrolysis Fructose Sucrose

铜绿假单胞菌单细胞与群体细胞生长规律模拟与验证*

董庆利¹ 王忻¹ 丁甜² 刘箐¹ 刘阳泰¹

(1. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 2. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058)

摘要: 采用单细胞生长流动成像系统, 观测并探究铜绿假单胞菌单细胞生长规律, 运用随机建模的方法构建单细胞与群体细胞之间的关系, 模拟铜绿假单胞菌群体细胞的生长并进行验证。同时, 通过多次模拟实验来探究不同初始接菌量对铜绿假单胞菌细胞生长迟滞期的影响。结果表明, 在 25℃ 和 35℃ 条件下, 模拟曲线基本能够呈现实际测得群体细胞生长的趋势, 模拟方法可以用来实现对群体细胞生长的预测。同时, 对初始接菌量为 0、1、2、4、8、16 和 100 个/mL 的铜绿假单胞菌生长进行多次模拟表明, 在 25℃ 和 35℃ 下, 其生长迟滞时间随初始接菌量的增大分别由 12.52 h 降低为 6.33 h, 由 8.61 h 降低为 4.01 h。通过单细胞水平模拟群体细胞生长过程, 能够更加明显地体现出细菌细胞生长过程中的不确定性与变异性, 为深入研究细菌细胞生长迟滞现象以及准确预测微生物的生长提供借鉴。

关键词: 铜绿假单胞菌 单细胞 迟滞期 流动成像系统 预测微生物学

中图分类号: TS251.5; O935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)09-0204-06

引言

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas Aeruginosa*) 是肉类食品中的优势腐败菌之一, 能够引起肉制品发粘^[1], 导致食品腐败。准确预测并抑制肉制品中铜绿假单胞菌的生长对肉制品保鲜或食品货架期延长具有重要意义。董庆利^[2] 等通过研究温度、pH 值和乳酸钠 (NaL) 浓度对铜绿假单胞菌迟滞期的影响, 建立了铜绿假单胞菌的一级生长模型和二级主参数模型, 从而获得铜绿假单胞菌生长的相关生长参数, 为预测和控制铜绿假单胞菌生长提供理论参考。

运用预测微生物学的方法, 从群体细胞水平构建生长模型来预测微生物生长规律已是较为成熟的手段, 而许多学者逐渐认识到食品污染通常是由很少的细菌菌落引起的^[3-5]。因此, 基于单细胞水平的微生物动力学研究已逐渐成为预测微生物学研究的热点之一^[6-8]。Elfwing^[9] 等搭建了单细胞生长流动成像系统, 实现了对单细菌细胞生长的连续监测。Kutalik^[10] 等基于单细胞生长流动成像系统, 对无害李斯特菌单细胞生长进行随机建模, 从而更好地预测了不同压力条件下无害李斯特菌单细胞的生长。然而, 单细胞或低接菌量下微生物的生长, 尤其是生

长迟滞时间极易受到环境变化的影响^[11], 其本身生长繁殖也存在变异性, 单细胞微生物生长的不确定性与变异性又会对群体细胞的生长产生影响。因此, 从单细胞水平预测群体细胞的生长显得尤为重要。

本文采用单细胞生长流动成像系统, 对铜绿假单胞菌单细胞生长进行监测与分析, 并建立单细胞与群体细胞生长规律之间的关系, 从而通过单细胞水平预测群体细胞生长过程, 为深入研究细菌细胞生长迟滞现象以及准确预测微生物的生长提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂与设备

1.1.1 菌株来源及菌悬液制备

铜绿假单胞菌分离自市售冷鲜猪肉中, 实验时进行平板划线, 在 27℃ 下活化 3 次, 选择性培养基的配置参照文献^[12]。取一环菌苔接种于 100 mL 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中混匀制得 PBS 菌悬液备用。另取一环菌苔接种于 300 mL 营养肉汤培养基 (NB) 中培养 18 h 使菌体浓度约达到 10⁸ 个/mL 备用。

1.1.2 主要设备

HL-2 型恒流泵 (上海嘉鹏科技有限公司);

收稿日期: 2013-09-02 修回日期: 2013-09-25

* 国家自然科学基金资助项目 (31271896、31371776)、上海市自然科学基金资助项目 (12ZR1420500) 和浙江省自然科学基金资助项目 (LQ13C200001)

作者简介: 董庆利, 副教授, 主要从事畜产品安全和质量控制研究, E-mail: qdong@usst.edu.cn

BX41TF-5 型生物显微镜(日本奥林巴斯株式会社);Nikon DS-Fi1 型显微镜数码摄像头、Nikon DS-U2 型 CCD 计算机端控制器(日本尼康株式会社)。

1.2 实验方法

1.2.1 单细胞生长流动培养

25℃下,取 150 μL 铜绿假单胞菌 PBS 菌悬液滴至载玻片表面,置于超净工作台 30 min 使足够多的细菌细胞粘附于载玻片表面。如图 1 所示,在超净工作台中,将无菌流动槽单体及接种好的载玻片按照从(a)到(c)的顺序组装好,并用水管胶带密封待用。

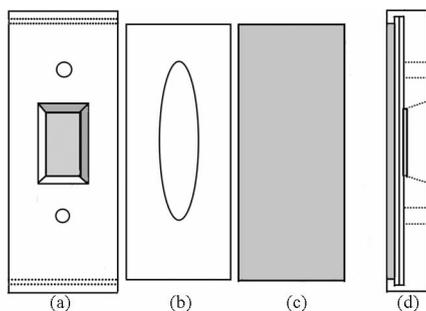


图 1 生长流动槽主要元件示意图

Fig. 1 Mail parts of flow chamber

- (a) 流动槽上盖(带嵌入中部的盖玻片和液体进出口管道口)
(b) 聚合物空间 (c) 载玻片 (d) 流动槽组合图

搭建单细胞生长流动成像系统(图 2),实验前用 75% 酒精冲洗管道 15 min 以上,再开启无菌 PBS 缓冲液润洗系统,为流动培养作好准备。铜绿假单胞菌细胞在 PBS 缓冲液中几乎不生长,关闭 PBS 缓冲液阀门,开启营养肉汤培养基阀门,开始细菌细胞流动培养。在流动液体环境中,液体将分裂后粘附力较弱的子细胞带走或移动到其他较远位置,而不影响目标子细胞生长分裂,同时方便研究者对目标细胞生长进行连续追踪与记录。实验中,系统管道液体速率约为 1.1 cm/s,生物显微镜调整为暗视场观察。启动 NIS-Elements 3.2 软件每隔 3~5 min 对流动槽中铜绿假单胞菌生长进行观测与拍

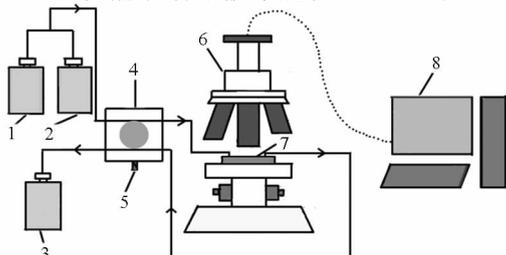


图 2 单细胞生长流动成像系统

Fig. 2 Flow chamber imaging system

1. 营养肉汤培养基 2. 磷酸盐缓冲液 3. 废液 4. 恒流泵
5. 流动控制开关 6. 显微镜 7. 单细胞生长流动槽 8. 计算机

照,记录细菌细胞生长分裂过程。

利用 Image-Pro Plus 6.0 软件对实验所得图片进行处理,获得铜绿假单胞菌单细胞生长变化数据(像素),并对实验约 30 个铜绿假单胞菌单细胞前 4 次分裂时间进行统计。

1.2.2 模拟群体细胞生长

在 25℃ 和 37℃ 下,分别对实验约 30 个铜绿假单胞菌单细胞进行追踪观察,记录单细胞前 k 次生长分裂时间。根据细胞二分裂增殖规律,对初始细菌细胞个数为 N 个/mL (N 为大于 1 整数)的群体细胞生长进行模拟。细胞每进行一次分裂,所需时间都由对应的单细胞分裂时间按照频数分布数据给出,超过 k 次分裂的时间按照第 k 次分裂的时间计算 (k 通常取 3 或 4)^[13]。以此类推,直至最终目标细胞个数达到给定要求。模拟过程由编写的 Java 程序实现,并通过 Matlab R2009b 软件(美国 Mathworks 公司)对模拟实验结果进行曲线拟合,拟合采用 Gompertz 模型,模型表述为^[14]

$$\lg N = N_0 + C \exp(-\exp(-B(t-M))) \quad (1)$$

式中 $\lg N$ —— t 时菌落常用对数值

N_0 ——随时间无限减小时渐进对数值(相当于初始菌数)

C ——随时间无限增加时菌增量的对数值

B ——时间 M 时相对最大生长速率

M ——达到相对最大生长速率所需要的时间

1.2.3 验证实验

取培养 18 h 后的铜绿假单胞菌菌悬液经无菌生理盐水稀释,制得初始接菌量约为 1 个/mL、10 个/mL、100 个/mL 的菌悬液。25℃ 和 37℃ 下分别恒温培养,每隔 1 h 取样进行平板菌落计数。验证实验结果与模拟实验拟合曲线一同采用 Matlab R2009b 作图。

1.2.4 铜绿假单胞菌生长迟滞期分布

为探究初始接菌量对铜绿假单胞菌生长迟滞期的影响,对初始接菌量 1 个/mL、2 个/mL、4 个/mL、8 个/mL、16 个/mL 和 100 个/mL 的铜绿假单胞菌生长至 10^5 个/mL 进行 50 次模拟,并采用 Gompertz 模型对模拟结果进行拟合,获得细胞生长迟滞期分布,分布结果采用 OriginPro 8SR0 v8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 铜绿假单胞菌单细胞生长情况

通过单细胞生长流动系统对铜绿假单胞菌单细胞生长分裂进行连续观测(图 3)。流动的液体将分裂后粘附力较弱的子细胞带走或移动到相对较远的位置,故分裂结束后,目标细胞数目没有增加。

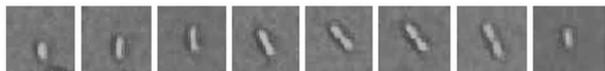


图3 单细胞分裂生长过程图

Fig. 3 Series images of *P. Aeruginosa* single cell division

对获得的图像进行分析,计算铜绿假单胞菌单细胞生长变化的像素大小(图4)。细胞像素大小随时间变化的趋势为波浪起伏状,而每一次骤降趋势都表示细胞完成了一次分裂过程,随时间的推移,很容易看出细菌细胞从体积增大到分裂到再增大的过程。

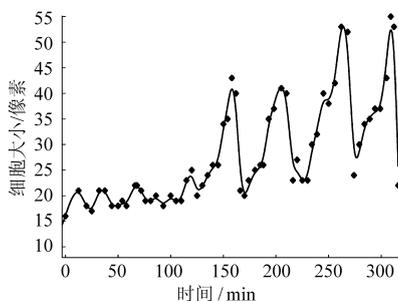


图4 25°C下铜绿假单胞菌单细胞分裂变化规律

Fig. 4 Changes of *P. Aeruginosa* single cell size at 25°C

同时,对同一铜绿假单胞菌菌群中约30个不同的单细胞分裂时间进行追踪记录,发现不同单细胞发生分裂的时间也各不相同,最短的在1 h左右就开始分裂,最长的在4 h左右才开始分裂,这说明单细胞生长具有随机性的特点。周康^[15]等对不同浓度沙门氏菌单细胞生长规律的研究中也得到了同样的结论。

对25°C下30个铜绿假单胞菌单细胞前4次分裂时间进行统计(图5),平均分裂时间见表1。可以看出第1次分裂时间较之后几次分裂时间长,这是因为第1次分裂时间包括细胞生长迟滞时间。

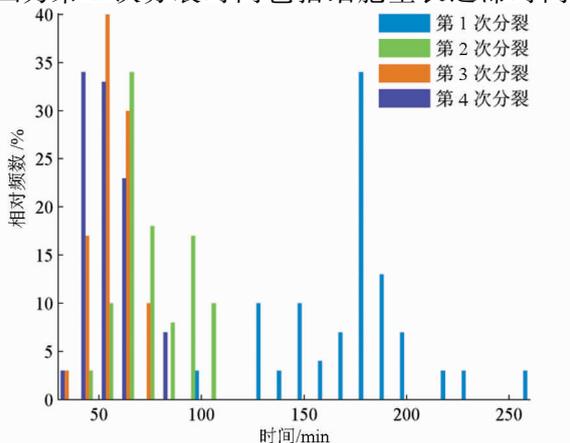


图5 25°C下铜绿假单胞菌单细胞分裂时间相对频数分布图

Fig. 5 Distribution of *P. Aeruginosa* single cells division time at 25°C

Métris^[16]等对大肠杆菌单细胞生长规律进行建模,认为细胞通常经过几次迭代后循序渐进地达到生长分裂的最大速度。同样从图5可以看到,细胞平均分裂时间随迭代次数增加而逐渐减少,说明细胞分裂速度在一定时间范围内呈增加的趋势。

表1 25°C下铜绿假单胞菌单细胞前4次分裂时间

Tab. 1 First four division times of *P. Aeruginosa*

single cells at 25°C			min
参数	平均值	标准偏差	
第1次分裂	169.8	31.66	
第2次分裂	77.93	18.77	
第3次分裂	56.50	9.458	
第4次分裂	54.90	10.48	

2.2 铜绿假单胞菌群体细胞生长模拟与验证

采用 Gompertz 模型对不同初始接菌量的铜绿假单胞菌群体细胞生长模拟结果进行拟合,拟合结果见表2。由表2可以看出,Gompertz 模型对模拟实验结果拟合效果较好。

表2 铜绿假单胞菌生长模拟实验结果拟合参数

Tab. 2 Growth simulation parameters of *P. Aeruginosa*

温度/°C	初始接菌量/ (个·mL ⁻¹)	R ²	剩余平方和
25	3	0.990 4	0.001 88
	10	0.798 1	0.024 25
	75	0.826 5	0.035 20
35	3	0.947 5	0.009 62
	14	0.965 3	0.011 07
	119	0.962 5	0.012 12

用实际测得的生长菌落数对模拟实验结果进行验证。由图6可以看出,不同温度条件下,模拟曲线基本能够呈现实测得群体细胞生长的趋势,说明模拟方法可以用来实现对群体细胞生长的预测。

2.3 初始接种量对迟滞期的影响

Aguirre^[17]等对无害李斯特菌生长迟滞期的研究中认为,在初始接菌量较小或细菌细胞生长受抑制条件下迟滞期大小随初始接菌量增大而减小,变异性随初始接菌量增大而变大。如图7所示,分别对25°C和35°C下,初始接菌量为0、1、2、4、8、16和100个/mL的铜绿假单胞菌群体细胞生长连续进行50次模拟,并采用 Gompertz 模型对所得模拟结果进行拟合,得到迟滞期分布规律,不同初始接菌量下细胞生长迟滞期大小见表3。由图7可以看出,初始接菌量越大,群体细胞生长迟滞期越短,25°C时迟滞期由12.52 h降低为6.33 h,35°C时迟滞期由8.61 h降低为4.01 h,且不同温度下,生长迟滞期分布随初始接菌量增大而越来越集中。

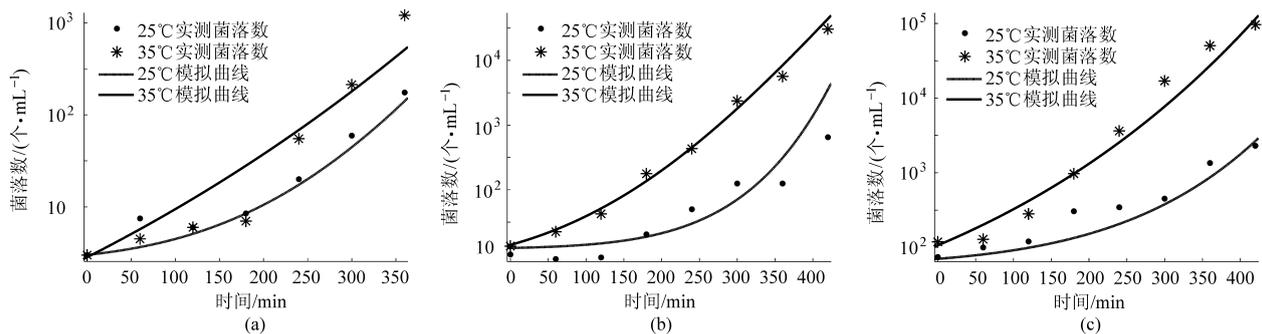


图6 不同初始接菌量铜绿假单胞菌生长模拟与验证

Fig. 6 Simulation and validation of *P. Aeruginosa* growth with different inoculum sizes

(a) 1个/mL (b) 10个/mL (c) 100个/mL

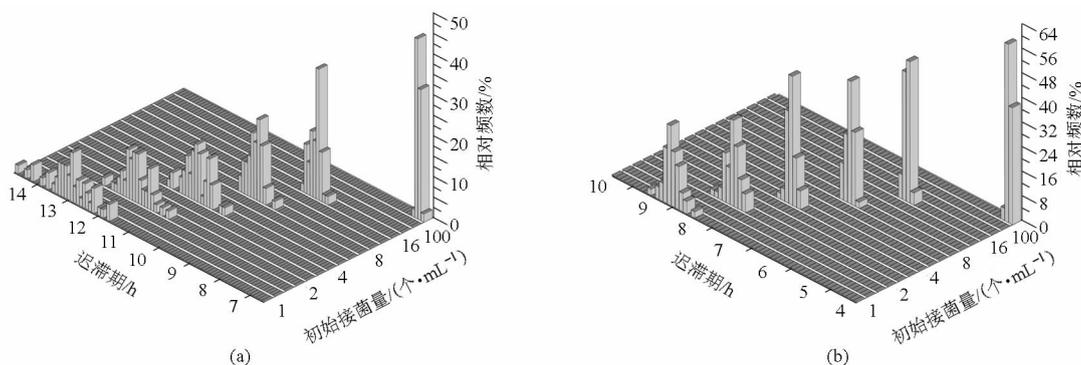


图7 初始接菌量对铜绿假单胞菌生长迟滞期的影响

Fig. 7 Effect of different inoculum size on the lag time of *P. Aeruginosa* growth

(a) 25°C (b) 35°C

表3 不同初始接菌量下细胞生长迟滞期

Tab. 3 Lag time of *P. Aeruginosa* growth under 25°C and 35°C with different inoculum sizes h

初始接菌量/ (个·mL ⁻¹)	25°C		35°C	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
1	12.52	0.641	8.61	0.198
2	11.40	0.409	7.87	0.172
4	10.45	0.374	7.16	0.111
8	9.59	0.223	6.47	0.087
16	8.66	0.169	5.78	0.062
100	6.33	0.064	4.01	0.033

3 讨论

细菌细胞在生长过程中会产生藻酸盐、多糖基质等物质粘附于惰性材料表面^[18],这也是单细胞生长流动槽实现流动培养微生物的前提。值得一提的是,细菌细胞大多以二分裂增殖的方式分裂,分裂后的子细胞形态、大小以及内在遗传物质等几乎没有差别。但是通过图3可以发现,细胞分裂后,其中一个子细胞会被液体带走而移出视野。产生这种现象的原因,可能是细胞分泌的能够使其粘附于惰性物质表面的各种基质物质分布和分配不是均等的,所以才有附着力较小的子细胞产生。

单细胞生长流动系统实现了对细菌细胞生长过

程的连续监测,但是也存在不足。细菌细胞生长到一定数量后,群体效应的作用会对微生物的生长产生影响^[19]。例如铜绿假单胞菌,其在生长过程中分泌N-乙酰高丝氨酸内酯(AHLs)等信号分子,当其浓度达到一定阈值时,启动某些基因的表达^[20],从而对细菌细胞的生长产生影响。基于单细胞生长流动成像系统(图2)对铜绿假单胞菌进行培养过程中,流动的液体带走子细胞的同时也带走了部分信号分子或其他影响细菌细胞生长的物质,这与食品中微生物生存的环境显然是不一样的。虽然流动培养微生物的方法有这样的弊端,但是并不能完全否定它的意义。因为,通过本实验中对初始接菌量为1个/mL、10个/mL、100个/mL铜绿假单胞菌生长的模拟结果表明(图6),在初始接菌量较小或细胞增长数目相对不多的情况下,单细胞生长流动系统和模拟实验基本能够实现对微生物生长的预测,且其考虑到单细胞生长的不确定性与变异性,使得预测结果更加准确。而实际生产流通中,对污染量较高或已经发生腐败现象的食品中微生物的生长进行预测与分析意义不大,最需要控制的还是低污染量或污染前期食品中微生物的生长情况,以有效预防和降低食品安全风险。

探究微生物生长迟滞期变化规律对于微生物定

量风险评估是至关重要的^[21]。由于模拟实验能够实现对较低接种量微生物生长的预测,于是继续采用模拟实验方法来探究初始接种量对细菌细胞生长迟滞时间的影响。这样做的优点,除了可以选取任意不同的初始接种量大小,还可以进行任意多次模拟,省时省力,并通过统计的方法来表现不同初始接种量微生物生长迟滞时间的分布。

通过预测微生物模型,能够得到微生物生长迟滞期等参数,且每个模型都有其判断微生物生长是否进入指数增长期的标准^[22]。例如,1个细胞分裂增殖到100个细胞,用模型拟合后判断其进入了指数增长期,但相同条件下,1个细胞分裂增殖到1000个细胞,拟合后发现在形成第100个细胞后可能仍没有进入指数增长期,而由此造成的差异是不能忽略的。故在本实验的模拟过程中,指定细胞分裂个数至 10^5 个/mL,因为 10^5 个/mL的目标细胞数对于不同初始接种量较低的模拟实验,产生的数据点个数差可以忽略,以此为标准来拟合生长曲线,才得到具有可比性的迟滞期。当然,实际食品环境中,微生物生长繁殖,细菌细胞个数可能远超过 10^5 个/mL,对实际食品中测得的微生物生长曲线进行拟合,其

迟滞时间可能更长。但从预防和降低食品安全风险的角度出发,宁可选择对无效-危险(Fail-dangerous)的情况进行有效监控,即保证在真正引发食品腐败变质的状态之前就对其进行预警,从而及时有效地控制食品中有害微生物的生长与繁殖。

4 结束语

采用单细胞生长流动系统对铜绿假单胞菌单细胞生长进行观察,发现单细胞生长具有随机性的特点,而对多个单细胞分裂时间的统计分析发现,细胞分裂速度在一定时间范围内呈增加的趋势。通过验证,基于细胞二分裂增殖与单细胞分裂时间模拟铜绿假单胞菌群体细胞生长过程的方法,可以实现对低接种细菌细胞生长的预测,并由此建立了铜绿假单胞菌单细胞与群体细胞生长之间的关系。对不同初始接种量的铜绿假单胞菌生长进行多次模拟实验,发现初始接种量越大,细菌细胞生长迟滞期越短。总之,从单细胞层面研究微生物生长动力学的方法,能够明显地体现出微生物生长繁殖过程中的不确定性与变异性,对深入探究微生物的生长规律及迟滞现象提供借鉴,完善食品风险评估体系。

参 考 文 献

- 1 Nychas G J, Skandamis P N, Tassou C C, et al. Meat spoilage during distribution[J]. *Meat Science*, 2008, 78(1-2): 77-89.
- 2 董庆利,姚远,赵勇,等. 铜绿假单胞菌的温度、pH值和乳酸钠主参数模型构建[J]. *农业机械学报*, 2014, 45(1): 197-202.
Dong Qingli, Yao Yuan, Zhao Yong, et al. Modelling establishment of the cardinal parameters model as a function of temperature, pH value and sodium lactate for *Pseudomonas Aeruginosa*[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(1): 197-202. (in Chinese)
- 3 Llaudes M K, Zhao L, Duffy S, et al. Simulation and modelling of the effect of small inoculum size on time to spoilage by *Bacillus stearothermophilus*[J]. *Food Microbiology*, 2001, 18(4): 395-405.
- 4 Kutalik Z, Razaz M, Baranyi J. Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2005, 232(2): 285-299.
- 5 Uyttendaele M, De Troy P, Debevere J. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 53(1): 75-80.
- 6 Ferrier A C R, Ecosse M, Hezard B, et al. Individual-based modelling combined with micro-scale modelling of foods[C] // Proceedings of the 7th International Conference on Predictive Modelling of Food Quality and Safety, 2011: 45-48.
- 7 Manios N K S G, Gounadaki A S, Skandamis P N. Single cell variability and population dynamics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in fresh-cut salads and their sterile liquid or solidified extracts[C] // Proceedings of the 7th International Conference on Predictive Modelling of Food Quality and Safety, 2011: 49-52.
- 8 Guillier O H L, Briandet R. A simple individual-based model to explore the spatial competition between *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in mixed-species biofilms with constant renewal of nutrients[C] // Proceedings of the 7th International Conference on Predictive Modelling of Food Quality and Safety, 2011: 53-56.
- 9 Elfving A, Lemarc Y, Barnyi J, et al. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(2): 675-678.
- 10 Kutalik Z, Razaz M, Elfving A, et al. Stochastic modelling of individual cell growth using flow chamber microscopy images[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105(2): 177-190.
- 11 Francois K, Devlieghere F, Smet K, et al. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 100(1-3): 41-53.
- 12 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京:中国农业出版社,1995.
- 13 Pin C, Baranyi J. Kinetics of single cells: observation and modeling of a stochastic process[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*,

- 2006, 72(3): 2163–2169.
- 14 Giannuzia A A P L, Zaritzky N. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 39(1–2):101–110.
- 15 周康, George Susie, Baranyi Jozesef, 等. 不同浓度沙门氏菌细胞生长分布规律研究[J]. 食品科学, 2012, 33(13): 254–258.
- Zhou Kang, George Susie, Baranyi Jozesef, et al. Modelling the growth distribution of *Salmonella* at different inoculum levels[J]. Food Science, 2012, 33(13): 254–258. (in Chinese)
- 16 Métris A, Le Marc Y, Elfwing A, et al. Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 100(1–3): 13–19.
- 17 Aguirre J S, Gonzalez A, Ozcelik N, et al. Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 164(1): 60–69.
- 18 张连波, 高庆国, 张广. 铜绿假单胞菌生物被膜研究进展 [J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(1): 137–140.
- Zhang Lianbo, Gao Qingguo, Zhang Guang. Advances in *Pseudomonas aeruginosa* bacterial biofilm[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2009, 13(1): 137–140. (in Chinese)
- 19 邱静, 董庆利, 程飞. 气调包装冷却猪肉中假单胞菌生长概率模型的构建 [J]. 农业工程学报, 2012, 28(13): 257–262.
- Qiu Jing, Dong Qingli, Cheng Fei. Establishment of growth probability model for *Pseudomonas spp.* in chilled pork with modified atmosphere package[J]. Transactions of the CSAE, 2012, 28(13): 257–262. (in Chinese)
- 20 赵丽娟, 谢晶. 冷却猪肉特定腐败微生物与群体感应现象研究进展 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(22): 295–399.
- Zhao Lijun, Xie Jing. Research process in specific spoilage organisms and quorum sensing in chilled meat[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(22): 295–399. (in Chinese)
- 21 Baranyi J, George S M, Koutlik Z. Parameter estimation for the distribution of single cell lag times [J]. Journal of Theoretical Biology, 2009, 259(1): 24–30.
- 22 Robin C. Mckellar X L, Lu Xuwen. Modeling microbial responses in food[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003.

Growth of *Pseudomonas Aeruginosa* Single Cells and Cell Colonies

Dong Qingli¹ Wang Xin¹ Ding Tian² Liu Qing¹ Liu Yangtai¹

(1. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

2. School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: A flow chamber image system was used to study the single cell growth of *Pseudomonas Aeruginosa*. A stochastic modeling process was applied to connect the growth of *P. Aeruginosa* single cells and cell colonies, and made it possible to simulate the population growth of *P. Aeruginosa*. Experimental bacteria growth viable counts using different initial inoculum sizes were detected to validate the simulation process. Meanwhile, many simulations were carried out to verify the effect of inoculum size on the lag time of *P. Aeruginosa*. The results indicate that the agreement between simulations and viable counts is good at both 25°C and 35°C and the simulation process can be one of methods for predicting the population growth of *P. Aeruginosa*. Through many simulations, it demonstrates that the lag time decreased from 12.52 h to 6.33 h at 25°C and 8.61 h to 4.01 h at 35°C as the initial inoculum size increased from 0 CFU/mL to 100 CFU/mL. The uncertainty and variability in bacteria cell growth are shown clearly in the simulation process. Also this method can be used as a reference to predict bacterial population growth and to study the lag behavior of microorganism.

Key words: *Pseudomonas Aeruginosa* Single cell Lag time Flow chamber image system Predictive microbiology