

微生物法测定食品中水溶性维生素的原理及进展

李全霞, 崔亚娟, 赵寅菲, 姜菲菲, 李 东
(北京市营养源研究所分析检测中心, 北京 100069)

摘 要: 本文简要介绍微生物法的分析步骤, 重点阐述微生物法测定食品中烟酸、泛酸、生物素、VB₆、叶酸和VB₁₂的方法原理、目前的应用情况及研究进展, 以期微生物法测定水溶性维生素提供一定的参考。
关键词: 微生物法; 水溶性维生素; 烟酸; 泛酸; 生物素; 叶酸

Principle and Progress of Microbiological Assay for Water-soluble Vitamins in Foods

LI Quan-xia, CUI Ya-juan, ZHAO Yin-fei, JIANG Fei-fei, LI Dong
(Analysis Laboratory of Beijing Nutrition Resources Institute, Beijing 100069, China)

Abstract: This paper has briefly described the analytical steps, principles, current applications and research progress of microbiological assay for nicotinic acid, pantothenic acid, biotin, vitamin B₆, folate and vitamin B₁₂ in foods, which will provide some references for the determination of water-soluble vitamins with microbiological methods.
Key words: microbiological method; water-soluble vitamins; nicotinic acid; pantothenic acid; biotin; folate
中图分类号: R151.3 文献标志码: A 文章编号: 1002-6630(2013)13-0338-07
doi:10.7506/spkx1002-6630-201313071

维生素是维持生命体正常生理功能和新陈代谢所必须的一类微量有机物质, 在机体内含量极少, 必须由食物供给。长期缺乏某种维生素, 就会导致其对应的缺乏症。水溶性维生素包括B族维生素和VC。其中B族维生素是辅酶或辅基的组成成分, 参与体内的代谢过程, 不能在体内贮存或贮存量很少, 并很容易消耗, 每天需要补充。

某种微生物会对特定维生素具有极强的特异性, 是其正常生长所必需的因子, 并且在一定条件下, 其生长与繁殖速度与溶液中该维生素的含量成一定的对应关系, 微生物法就是根据此原理对该维生素进行定量。微生物法的分析步骤一般分为以下几步: 1)测试菌液的制备, 包括日常固体培养基上菌种的转接活化及液体种子培养液的制备。2)试样及标准的制备, 包括试样管和标准曲线管的制作。3)测定用培养基的制备, 目前可以直接使用商业化生产的专用测定目标维生素的培养基进行配制。4)灭菌, 接种和培养。5)测定, 方法主要有酸度法和光密度法两种, 目前常用的是光密度法。

微生物法中至关重要的工具是测定用的菌株, 目前我国国家标准中使用的菌株中英文名称及其曾用名见表1, 可知, 这4株菌中除了测定VB₆的是酵母菌外, 其他均为乳酸杆菌。乳酸杆菌是非致病菌, 营养需求简单, 在合成和半合成的培养基中容易生长, 不易发生变异, 在实验室中经过多年的传代依然能保持良好的特异性; 乳酸

杆菌是微需氧菌, 因此在有限空间的试管中也能进行良好生长, 基于乳酸杆菌的这些优势, 有利于用试管法测定维生素。

表1 现行国家标准中用于测定水溶性维生素的菌株
Table 1 Assay strains used for determining water-soluble vitamins in current national standard

现用名	曾用名	ATCC 编号	适用标准编号	维生素种类
鼠李糖乳酸杆菌 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	干酪乳酸杆菌 (<i>Lactobacillus casei</i>)	7469	GB/T 5009.85—2003 GB/T 5009.211—2008 GB 5413.16—2010	VB ₂ 叶酸 叶酸
植物乳酸杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	阿拉伯乳酸杆菌 (<i>Lactobacillus arabinosus</i>)	8014	GB/T 5009.210—2008 GB 5413.17—2010 GB/T 5009.89—2003 GB 5413.15—2010 GB 5413.19—2010	泛酸 泛酸 烟酸 烟酸 游离生物素
莱士曼氏乳酸杆菌 (<i>Lactobacillus leichmannii</i>)	—	7830	GB 5413.14—2010	VB ₁₂
酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	卡尔斯伯酵母菌 (<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>)	9080	GB/T 5009.154—2003	VB ₆

注: —, 无。

微生物法中另外一个关键的步骤就是从复杂的食品基质中提取目标维生素, 提取方法对结果的影响占整个实验误差的很大部分。提取方法的选择基于以下几方面: 1)食品基质的特性; 2)食品基质中维生素存在的形式(是原生形式的所占比重大还是添加形式比重大, 游离

态较多还是结合态较多以及结合态的结合形式也不尽相同); 3) 维生素对热和pH值的稳定性; 4) 分析方法的选择性和特异性。通常, 水溶性维生素的提取方法包括用缓冲液或硫酸溶液进行水解、调节pH值沉淀蛋白或者使用合适的蛋白沉淀剂、用合适的酶进行酶解等。

1 微生物法在测定水溶性维生素方面的应用

1.1 烟酸和烟酰胺的微生物法测定

烟酸和烟酰胺是吡啶的衍生物, 在体内以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)的形式存在, NAD和NADP是许多脱氢酶的辅酶, 在氧化还原反应中起传递氢的作用。膳食中的烟酸和烟酰胺主要以NAD和NADP的形式存在, 加工过的食品中NAD和NADP已经部分水解成烟酸和烟酰胺, 在植物中, 烟酸与大分子结合, 很难被利用。谷物中, 烟酸主要与多聚糖、多肽和肽聚糖结合, 仅有25%的这种结合态烟酸能被胃液水解。

1938年, Snell等^[1]发现泛酸和烟酸是某些乳酸杆菌的必需生长因子。1941年, Snell等^[2]利用植物乳酸杆菌对烟酸和烟酰胺及其辅酶的敏感性, 测定了动物血液、组织和几种谷物中的烟酸和烟酰胺, 对于动物血液和组织, 回收率在94%~104%之间, 直接用水提取即可, 碱提取不能提高含量。对于谷类样品充分的研磨后用水提取或者直接用8%的氢氧化钠提取能达到相同的效果。Teply等^[3]利用此方法测定各种食品中的烟酸和烟酰胺。数据表明大多数食品用水直接提取即可, 但是谷类必须用酸或碱才能提取完全。Andrews等^[4]用同样方法测定谷物及谷物制品中的烟酸和烟酰胺, 发现提取方式对结果会有较大影响, 用水或弱酸提取比强酸或强碱提取的结果偏低。这种差异可能有两个原因: 1) 由于在提取过程中某些促生长物质的形成, 2) 强酸或强碱处理使得烟酸的低活性或无活性前体水解形成有活性的烟酸而释放出来。Krehl等^[5]建议用酸处理, 因为氢氧化钠处理高脂肪酸样品时可能会形成肥皂。2006年, Ball等^[6]根据提取条件的不同提出总烟酸(total niacin)和游离烟酸(free niacin)的概念。通常, 总烟酸指用碱和0.5mol/L或1mol/L酸提取出来的烟酸含量, 而游离烟酸指用0.1mol/L酸提取出来的烟酸含量。殷晓红等^[7]利用1mol/L硫酸提取食品中的总烟酸; 根据结合烟酸在浓度为0.1mol/L盐酸溶液中稳定的特点, 用浓度为0.1mol/L盐酸在水浴上提取样品中的游离烟酸, 避免高温及强酸使结合烟酸分解。

除了植物乳酸杆菌外, 鼠李糖乳杆菌^[8]、肠膜明串珠菌亚种^[9]、乳脂酵母(*Torula cremoris*) ATCC 2512^[10], 变形杆菌(*Proteus* HX19)^[11]等也被用来测定烟酸。植物乳酸杆菌对烟酸、烟酰胺、烟酰甘氨酸(一种无活性的代谢物)、

NAD, 以及谷物中的结合态烟酸都能进行很好的利用, 但不利用色氨酸^[12]。因此在美国谷物化学师协会(AACC)和美国分析化学家协会(AOAC)标准中都规定用植物乳酸杆菌测定食品中的总烟酸。

1.2 泛酸的测定

泛酸是泛解酸和 β -丙氨酸组成的一种化合物, 对热、酸、碱均不稳定。泛酸广泛存在于动物和植物组织中, 主要以辅酶A(CoA)和酰基载体蛋白(ACP)这种结合态形式存在。

泛酸是所有乳酸杆菌生长的必需因子, 1940年, Pennington等^[13]根据泛酸的这一特性, 将测定VB₂的原理运用于泛酸, 提出了用鼠李糖乳杆菌测定泛酸的方法。对天然样品, 直接用水溶解, 高压灭菌30min提取, 成功地测定了酵母、肝脏、牛奶、牡蛎和蘑菇提取物等的泛酸。1941年, Strong等^[14]将此方法运用于更多的样品上, 包括蛋黄、全麦、土豆、莴苣以及动物组织等。同时, 啤酒酵母、摩氏变形菌和植物乳酸杆菌都被用来测定泛酸, 其中报道最多的是植物乳酸杆菌。1944年, Skeggs等^[15]利用植物乳杆菌对泛酸的特性, 对Snell等^[2]的基础培养基进行修改, 将限制因素由烟酸改为泛酸, 从而进行泛酸定量分析。对酵母提取物、蛋白胨、麦芽提取物等物质进行分析, 同鼠李糖乳杆菌测定结果进行比较, 结果非常一致, 回收率达到92%~106%。1945年, Hoag等^[16]利用植物乳酸杆菌测定泛酸, 与鼠李糖乳杆菌进行比较, 认为鼠李糖乳杆菌在含有微量淀粉、脂肪和脂肪酸的环境下, 生长不规律, 容易使结果偏高。因此, 样品必须酶解并除去脂肪, 而植物乳酸杆菌的生长并不受淀粉和脂肪酸的明显刺激。1959年, Clarke等^[17]比较这2株菌对泛酸的反应, 在同样的标准范围内, 植物乳杆菌的标准曲线线性更好, 而鼠李糖乳杆菌的线性部分较短, 曲线中间斜率突然变大。

起初微生物法测定泛酸时, 由于泛酸对酸、碱的不稳定性, 样品提取都用水溶解, 在中性条件下直接提取或高压处理。Strong等^[14]发现用淀粉酶处理酵母和动物组织后, 得到的泛酸含量会增加。Willerton等^[18]研究了淀粉酶酶解对微生物法分析酵母和肝脏中天然泛酸的影响, 37℃酶解48h, 结果增加, 但是比用鸡生长法测定的值仍然低, 而且酶处理后会产生干扰鼠李糖乳杆菌代谢的物质。接着胰酶、胃蛋白酶等都被用来处理样品。1949年, Novelli等^[19]利用肠磷酸酶和鸽子肝脏提取液处理动物组织, 得到满意的结果, 泛酸含量比用淀粉酶处理的值提高4倍多。但是肝脏本身的辅酶A含量比较高, 丙酮提取的肝脏提取物造成较高的空白值。而且酶的活力不稳定, 室温条件下很快就会失活。1951年, Novelli等^[20]利用离子交换树脂处理鸽子肝脏, 大大降低了空白值并不会破坏酶的活力。后来经过多次修改, 现在商品化的鸽子肝脏提取物已经广泛被使用。

1.3 生物素的测定

生物素广泛分布在动物和植物组织中, 含量低微。一般以游离态或与氨基酸、蛋白质结合的形式存在。通常植物组织中包含的大部分是游离态的生物素, 而动物组织中大部分是结合态生物素。例如, 在苜蓿中80%的生物素是游离态, 而在鱼粉中只有10%是游离态生物素^[21]。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、鼠李糖乳杆菌、丁酸杆菌(*Clostridium butylicum*13)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、索多恩微球菌(*Micrococcus sodonensis*)、植物乳酸杆菌等都被用来测定生物素。酿酒酵母可以利用生物素、脱硫生物素、二氨基生物素、生物胞素、生物素硫氧化物、二氨基壬酸以及很多未知的生物素衍生物, 因此测定值代表着样品中的总生物素, 比用乳酸杆菌测定的结果偏高。脱硫生物素会使鼠李糖乳杆菌产生抗生物素的活性, 但却不会影响植物乳酸杆菌的生长, 植物乳酸杆菌的生长因子简单、繁殖快, 生长过程中干扰因子较少, 在实验过程中结果比其他菌种可靠性高, 所以应用的最为广泛^[22-23]。

植物乳酸杆菌只能利用游离的生物素, 因此在样品分析前必须使结合态的生物素解离出来。通常硫酸被用来水解样品, Axelrod等^[24]利用2mol/L盐酸水解草粉, 结果生物素几乎全被破坏, 这可能是其中的氯离子导致生物素氧化变成砷或亚砷化合物, 也不是所有样品的生物素都会被破坏, 有些天然样品本身含有保护生物素的物质, 使得生物素不会被氧化。

Lampen等^[25]的实验表明, 动物组织和酵母用2mol/L H_2SO_4 于121℃水解1h能达到最大值, 结果提高了2~6倍, 但是酵母水解2~3h后会开始产生一定的破坏, 因此采用1mol/L H_2SO_4 于121℃水解2h相对合适; 对于西红柿、苜蓿、扁豆、菠菜等蔬菜和水果类食品用1mol/L H_2SO_4 提取会破坏生物素, 结果比用水提取0.5h的值还低, 尤其是西红柿破坏了将近60%。Schweigert等^[26]对肉产品做了1、2、3mol/L H_2SO_4 于121℃水解2、4、6h的对比, 结果显示2、3mol/L H_2SO_4 水解2h就能水解完全, 长时间水解会破坏大量的生物素。Scheiner等^[27]分别用1mol/L H_2SO_4 和3mol/L H_2SO_4 水解各种样品, 结果表明3mol/L H_2SO_4 水解处理时, 植物组织中的生物素不稳定, 受到一定的破坏; 而动物组织中结合态的生物素能更多地游离出来, 所以推荐用1mol/L H_2SO_4 于121℃水解植物性来源的样品2h、3mol/L于 H_2SO_4 121℃水解动物性来源的样品2h。Maeland等^[21]在分析低温干燥的胡瓜鱼粉中的生物素含量时, 用1.5mol/L H_2SO_4 和3mol/L H_2SO_4 于121℃分别水解3h和2h, 结果没有显著差异, 平均生物素含量为 $(0.52 \pm 0.02)mg/kg$ 和 $(0.51 \pm 0.02)mg/kg$, 所以用1.5mol/L H_2SO_4 水解3h就能充分提取出样品的结合态生物素。基于动物和植物组织水解效果的差异, 很难用一种统一的酸

水解模式使得生物素前处理过程程序化。目前我国国标中, 只提出针对婴幼儿食品和乳品采用0.5mol/L H_2SO_4 于121℃水解30min来提取游离的生物素。

1.4 VB₆的测定

VB₆即吡哆素是吡哆的衍生物, 有吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺3种形式, 在机体内主要以磷酸酯的形式存在, 在酸性条件下稳定。

理想的测定总VB₆的菌种必须能同时利用吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺, 而乳酸杆菌不能利用吡哆醇, 因此被排除在外。酿酒酵母能同时利用吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺, 是应用最广的测定VB₆的酵母菌。但是, 酿酒酵母对吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺的特异性并不完全相同, 对吡哆醇最好, 其次是吡哆醛, 吡哆胺最差, 因此也有人建议用柠檬克勒克酵母(*Kloeckera apiculata* ATCC 9774)测定。1980年, Guilarte等^[28]比较了酿酒酵母和柠檬克勒克酵母对游离的VB₆的利用情况, 结果显示在2~10ng范围内, 柠檬克勒克酵母对3种形式的VB₆利用非常一致, 而酿酒酵母却明显有不同的反应, 利用吡哆醛没有吡哆醇好, 利用吡哆胺的能力更差; 在0.2~1ng范围内, 酿酒酵母的这种差异更明显, 而柠檬克勒克酵母则稍有差异; 在10~50ng范围内这2株菌的差异基本上完全消失。1982年, 对这一结论Gregory^[29]提出了不同的看法, 他利用与Guilarte等^[28]同样培养基制备的种子及同样的分析测定培养基进行这2种菌的对比实验, 发现在2~10ng范围内柠檬克勒克酵母出现和酿酒酵母类似的反应。1983年, Guilarte等^[30]对Gregory^[29]的异议重新进行了对比实验, 结果跟以前仍然一致, 因此认为对这种矛盾的造成可能跟实验的环境及操作人员等有关, 包括生长过程中所使用培养容器、振荡频率的不同所造成的溶氧浓度的差异, 以及接种和培养方式、培养基的浓度等。

酿酒酵母对吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺的差异反应会导致人们在对主要含吡哆胺的样品分析时, 因为一般使用吡哆醇做标准曲线, 因此会低估样品中的VB₆含量(例如一些肉类产品)。为了避免这种情况的发生, 1969年, Polansky等^[31]利用Dowex 50离子交换柱分离吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺, 再用微生物法分别测定这3种成分, 结果比不分离就测定的值普遍高一些。后来这一方法被AOAC采用。

酿酒酵母只能利用游离态的吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺, 所以必须进行有效的样品前处理, 使样品中的吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺都释放出来。Atkin等^[32]建议用0.022mol/L的硫酸水解1h或者用淀粉酶处理大多数样品, 但是全麦和全麦制品需用0.22mol/L硫酸水解。Rabinowitz等^[33]用盐酸水解达到和硫酸同样的效果。他们比较了1mol/L和0.022mol/L盐酸的水解效果, 发现用1mol/L的盐酸水解干酵母、肝粉和鲜肉1h得到的值较

低,延长至5h,结果增加,但仍没有0.022mol/L的盐酸水解5h能得到的值高。对于植物性样品同样是0.022mol/L盐酸水解5h能得到最大值,除了米糠需要用1mol/L的盐酸才能水解充分。在第17版的AOAC 961.15《食品中维生素B₆的测定方法》中,动物产品在121℃用0.44mol/L HCl水解5h,植物产品121℃用0.055mol/L HCl水解2h。在我国的国家标准GB/T5009.154—2003《食品中维生素B₆的测定方法》中规定用0.022mol/L硫酸121℃水解5h来测定食品中的VB₆。王为黎等^[34]认为不同样品可分别对待,保健食品属强化食品,其中VB₆是人为添加的,以游离状态存在于保健食品中,因此可缩短酸解时间至30min左右即可。天然食品中VB₆以结合的状态存在,为了使其游离出来,需高温高压5h。

1.5 叶酸的测定

叶酸又称为蝶酰谷氨酸,由2-氨基-4-羟基-6-甲基-蝶呤、对氨基苯甲酸和谷氨酸三部分组成,在中性和偏碱性条件下稳定。

常用的检测叶酸的菌株有鼠李糖乳杆菌ATCC 7469、粪链球菌(*Enterococcus hirae*, 以前被称为*Streptococcus faecalis*)ATCC 8043、啤酒小球菌(*Pediococcus cerevisiae*) ATCC 8081。此3种微生物对不同形式叶酸的敏感度不同。粪链球菌只对非甲基化叶酸敏感,如叶酸(PteGlu)、二氢叶酸(DHF)和四氢叶酸(THF),可用于鉴别分析各种形式叶酸在不同检测物中的分布。啤酒小球菌对甲基化叶酸也不敏感。鼠李糖乳杆菌对单谷氨酸叶酸、含2或3个谷氨酸叶酸(PteGlu2和PteGlu3)及其还原型衍生物均敏感,是3种微生物中反应谱带最宽的一种,也是最为常用的菌株^[35]。

自然界中的叶酸主要以蝶酰多聚谷氨酸的形式存在。鼠李糖乳杆菌只能利用3个谷氨酸尾以下的叶酸,因此蝶酰多聚谷氨酸必须酶解转换成蝶酰单谷氨酸或含2个和3个谷氨酸的叶酸才能被完全利用。这种酶就是 γ -谷氨酰基肽酶,又称叶酸转氨酶或叶酸水解酶。叶酸转氨酶的来源很多,目前应用最广泛的来源是鸡胰腺或猪肾脏,其次是人类或大鼠的血清,其各自的特性如表2^[36]。

表2 各种来源的叶酸转氨酶的特性
Table 2 Properties of folate conjugase from various sources

来源	优点	缺点	最适pH	产物
鸡胰腺转氨酶	不易被抑制,较稳定	不能用于HPLC法	7.8	蝶酰双谷氨酸
大鼠血清	易获取,比较稳定,便宜	易被抑制	7.0	蝶酰单谷氨酸
人类血清	内源叶酸少,使用较方便,便宜	可靠性不强	4.5~5.0	蝶酰单谷氨酸
猪肾脏转氨酶	较方便,便宜	含有大量的内源叶酸,易被抑制	4.5~5.0	蝶酰单谷氨酸

起初利用微生物法测定叶酸,样品前处理只涉及2个步骤,包括加热处理使与蛋白结合的叶酸游离出来,以及利用叶酸转氨酶使多聚谷氨酸尾形式的叶酸转换成单谷氨酸尾形式的叶酸。这种传统的处理方法持续了几

十年,直到20世纪80年代,很多研究者报道只使用叶酸转氨酶并不能非常有效地释放出结合态的叶酸,反而增加蛋白酶或淀粉酶处理会提高某些食品中的叶酸含量。1990年, Martin等^[37]报道使用蛋白酶、淀粉酶和叶酸转氨酶联合提取12种食品的叶酸,平均提高了19%。同样de Souza等^[38]也发现三酶联合提取能显著提高某些样品中的叶酸含量,其中黑麦面包和牛腩中的叶酸含量提高到只用转氨酶处理结果的500%和340%。这说明传统的只用转氨酶提取的某些样品中的叶酸并不完全,最近的研究进一步地证实了三酶联合提取对某些样品比单酶提取更有效。1997年, Tamura等^[39]报道利用三酶联合提取几种食品中的叶酸含量平均大约是单酶提取含量的271%。1998年, Rader等^[40]报道测定56个强化的谷类产品,大多数的测定样品用三酶联合提取的结果比单酶提取大约提高了20%~30%。

但是,并不是所有的样品用三酶联合提取方法都有效,所用酶的数目和类型还是由样品的成分和特性决定。例如,对于肉与肉制品用淀粉酶,而对淀粉制品却用蛋白酶是不合适的。2003年, Iwatani等^[41]的实验表明用三酶联合处理芥兰的结果并没有单酶处理的结果高。2004年, Pandrangi等^[42]用微生物法检测菠菜中的叶酸含量,在提取叶酸的过程中用3种不同的酶分别组合处理菠菜提取物,然后进行叶酸检测,结果表明用蛋白酶和转氨酶处理菠菜提取物的总叶酸含量是只用转氨酶处理的大约2倍,而用淀粉酶、蛋白酶和转氨酶3种酶处理菠菜提取物的总叶酸含量却仅比蛋白酶和转氨酶处理结果低了将近40%。可见蛋白酶对从菠菜中释放的叶酸起作用,而淀粉酶是无效的。

然而,淀粉酶、蛋白酶和转氨酶处理的顺序是否会对提取结果有影响呢? 1990年, Martin等^[37]提出先用转氨酶和淀粉酶处理,再用蛋白酶处理。后来Tamura等^[39]提出转氨酶处理应该在所有的叶酸从食品基质中释放出来之后进行。Rader等^[40]报道先用蛋白酶处理比先用淀粉酶处理某些强化谷类制品,其总叶酸有显著提高。在AOAC方法2004.05谷物及谷物制品中总叶酸-三酶联合提取微生物分析法中,规定对谷物和谷物食品进行前处理时,先用蛋白酶37℃酶解3h,再用淀粉酶37℃酶解2h,最后用转氨酶37℃酶解16h。2005年, Hyun等^[43]推荐先用蛋白酶37℃酶解2h,再用淀粉酶和转氨酶37℃酶解2h,这样既可以释放最大量的叶酸,又可以节省时间。

总之,叶酸测定的样品前处理过程应视样品种类而定,适宜的前处理方法有助于获得最大检出结果。强化剂型样品可直接水解,而含高蛋白质、高淀粉的样品需用淀粉酶、蛋白酶和转氨酶联合处理。

1.6 VB₁₂的测定

VB₁₂又称为钴胺素,分子结构复杂,含有钴。VB₁₂

在体内因结合的基团不同,可有多种形式存在,如氰钴胺素、羟钴胺素、甲基钴胺素和5'-脱氧腺苷钴胺素,以辅酶的形式参加一碳基团的代谢。其中5'-脱氧腺苷钴胺素是VB₁₂在体内的主要存在形式,可参与构成多种变位酶的辅酶;甲基钴胺素是甲基转移酶的辅酶,与胆碱等合成有关。

可用来测定VB₁₂的菌株有莱士曼氏乳酸杆菌、大肠杆菌变异株、眼虫藻(*Euglena gracilis*)、汉母赭胞藻(*Ochromonas malhamensis*)等。大肠杆菌和莱士曼氏乳酸杆菌是最常用的菌株。大肠杆菌的灵敏度较差,可以利用甲硫氨酸以及几乎所有已知的各种形式的钴胺素;莱士曼氏乳酸杆菌可以利用脱氧核糖核苷、脱氧核糖核苷酸、氰钴胺素及其各种形式的非氰基钴胺素;眼虫藻和汉母赭胞藻的特异性和灵敏度都很高,但是它们的生长时间都较长约5~7d,而且前者的培养必须在光照条件下进行^[44]。所以,莱士曼氏乳酸杆菌是目前应用最多的测定VB₁₂的菌株。

莱士曼氏乳酸杆菌可以广泛利用各种形式的钴胺素,Muhammad等^[45]研究了莱士曼氏乳酸杆菌对氰钴胺素、羟钴胺素、亚硫酸钴胺素、双氰钴胺素、甲基钴胺素、亚硝酸钴胺素和腺苷钴胺素的生长反应,发现莱士曼氏乳酸杆菌对氰钴胺素、羟钴胺素、亚硫酸钴胺素、双氰钴胺素和亚硝酸钴胺素的反应一致,但是腺苷钴胺素产生较高的反应,而腺苷钴胺素反应较低,因此若样品中的腺苷钴胺素或甲基钴胺素较高,则利用氰钴胺素作为标准,测定结果会偏高或偏低。他们建议将腺苷钴胺素和甲基钴胺素溶液在荧光灯条件下照耀,1h内能完全转变成羟钴胺素,这样就可以准确定量。

VB₁₂的提取主要包括两方面:1)将与蛋白结合的钴胺素释放出来;2)将不稳定形式的钴胺素转变为稳定状态的氰钴胺素或亚硫酸合钴胺素。由于氰化物的毒性,现在都用偏亚硫酸钠溶液来提取VB₁₂,使溶液中的氰钴胺素或羟钴胺素转变成亚硫酸合钴胺素。但是最终测定培养液中的偏亚硫酸钠溶液必须小于0.03mg/mL,否则会抑制莱士曼氏乳酸杆菌的生长。

2 微生物法的发展

微生物法的诞生至今已有60a左右的历史,随着分析理论和技术的快速发展,分析方法逐渐走向多元化,很多改良的微生物分析法相继出现。1970年,Davis等^[46]利用1株具有氯霉素抗性的鼠李糖乳杆菌及在添加有氯霉素的培养基中进行叶酸分析,避免灭菌带来的叶酸损失。20世纪80年代初,Grossowicz^[47]、Wilson^[48]等相继提出利用甘油保护的冷冻鼠李糖乳杆菌测定叶酸,这样可以使微生物法的测定更加标准化,使测定时间由原来的至

少4d缩短到2d。黎旭茹等^[49]应用自动浊度微生物分析仪对样品进行自动稀释,自动检测标准溶液和样品溶液中的菌体生长浊度,建立应用自动浊度微生物分析仪定量测定多种维生素营养片中生物素含量的方法。王丽丽等^[50]利用平板生长圈法测定复杂有机样品中的生物素含量。郑巍振等^[51]利用管碟法建立了一种方便快捷的测定生物素方法。卢京光等^[52]建立在线微生物浊度法测定多维元素片中微量VB₁₂的含量,克服了手工测定烦琐、不易获取最佳检测时间的缺点,获得了良好的标准曲线和生长曲线,完全符合浊度法测定的要求,可获得满意的实验结果。

通常微生物法测定过程中使用试管进行培养,在大批量的样品检测时,则要使用大量的试管,这样工作量会非常大,96孔酶标板的引用大大降低了工作强度。廖冰君等^[53]指出德国拜发公司推出VitaFast[®]维生素检测试剂盒。该试剂盒采用的原理与国际标准完全相同,引入96孔酶标板和实验室一般常规配备的酶标仪,以目前普遍接受的ELISA微孔板方法为形式和载体,进行维生素的测定。该法检测准确率高(偏差系数<10%),标准参考样品的回收率可达95%~105%,但是费用昂贵。徐文婕等^[54]将甘油冷冻保存的乳酸杆菌氯霉素耐药株与96孔酶标板相结合,建立了96孔板微生物法检测血浆中的叶酸,该法还可用于其他生物组织和食品中叶酸含量的测定,这对国内开展叶酸检测有着较大的意义。刘志楠等^[55]利用德国IFP公司的泛酸检测试剂盒和高效液相色谱法分别测定牛奶中的泛酸,结果显示微生物法和高效液相法的检测相一致。

3 结 语

微生物法是经典的维生素测定方法,可灵敏地检测出具有生物活性的维生素,反映的是基质中总维生素的含量,这是微生物法区别于其他方法的最大特点,也是仪器分析方法很难做到的。因此现行许多国际标准方法仍将微生物法作为部分维生素分析的标准方法,在第18版的AOAC标准方法中,食物中生物素、泛酸、叶酸、VB₁₂和烟酸的第一分析方法均为微生物法。在我国现行的国家标准中也仍用微生物法测定婴幼儿食品和乳品中的生物素、泛酸、叶酸、VB₁₂、烟酸以及食品中的VB₆、VB₂、烟酸、泛酸、叶酸。

微生物法的优点是成本低、可操作性强、灵敏度高,适合于长期稳定、大批量的试样测定分析;缺点是耗时长、准确度较低、重复性较差。随着科学技术的飞快发展,很多仪器分析方法被用来检测含低质量分数维生素的天然食品,例如色谱-质谱联用法、生物传感器法等。但是仪器分析方法只能针对某种特定维生素或维生素衍生物进行定量,如果对所有类型的维生素成分进行

测定, 难度很大, 成本也比微生物法高, 所以在进行分析检验时, 实验人员可以根据自己的工作需求来选择分析方法。

参考文献:

- [1] SNELL E E, STRONG F M, PETERSON W H. Pantothenic and nicotinic acids as growth factors for lactic acid bacteria[J]. J Am Chem Soc, 1938, 60(11): 2825.
- [2] SNELL E E, WRIGHT L D. A microbiological method for the determination of nicotinic acid[J]. J Biol Chem, 1941, 139: 675-686.
- [3] TEPLY L J, STRONG F M, ELVEHJEM C A. The distribution of nicotinic acid in foods[J]. The Journal of Nutrition, 1942, 23: 417-423.
- [4] ANDREWS J S, BOYD H M, GORTNER W A. Nicotinic acid content of cereals and cereal products[J]. Industrial and Engineering Chemistry, 1942, 14(8): 663-666.
- [5] KREHL W A, STRONG F M, ELVEHJEM C A. Determination of nicotinic acid-modifications in the microbiological method[J]. Industrial and Engineering Chemistry, 1943, 15(7): 471-475.
- [6] BALL G F M. Vitamins in foods analysis, bioavailability, and stability[M]. New York: Taylor & Francis, 2006: 323.
- [7] 殷晓红, 杨金宝, 刘波, 等. 微生物法测定食品中的烟酸和烟酰胺[J]. 中国乳品工业, 2003, 31(2): 32-35.
- [8] CLEGG K M, KODICEK E, MISTRY S P. A modified medium for *Lactobacillus casei* for the assay of B vitamins[J]. Biochem J, 1952, 50(3): 326-331.
- [9] JOHNSON B C. The microbiological determination of nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinuric acid[J]. J Biol Chem, 1945, 159: 227-230.
- [10] WILLIAMS W L. Yeast microbiological method for determination of nicotinic acid[J]. J Biol Chem, 1946, 166: 397-406.
- [11] JOHNSON B C, GROSSOWICA N, SHERSTINSKY Y E. An improved microbiological method for the determination of nicotinic acid based on the use of *Proteus HX19*[J]. J Biol Chem, 1947, 167: 101-105.
- [12] BALL G F M. In Bioavailability and analysis of vitamins in foods[M]. London: Chapman & Hall, 1998: 319-359.
- [13] PENNINGTON D, SNELL E E, WILLIAMS R J. An assay method for pantothenic acid[J]. J Biol Chem, 1940, 135: 213-222.
- [14] STRONG F M, FEENEY R E, EARLE A. Microbiological assay for pantothenic acid[J]. Industrial and Engineering Chemistry, 1941, 13(8): 566-570.
- [15] SKEGGS H R, WRIGHT L D. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid[J]. J Biol Chem, 1944, 156: 21-26.
- [16] HOAG E H, SARELT H P, CHELDELIN V H. Use of *Lactobacillus arabinosus* 17-5 for microassay of pantothenic acid[J]. Industrial and Engineering Chemistry, 1945, 17(1): 60-62.
- [17] CLARKE M F. Factors influencing validity and of pantothenic acid estimation microbiological assay with *Lactobacillus*[J]. Analytical Chemistry, 1959, 29(1): 135-139.
- [18] WILLERTON E, CROMWELL H. Microbiologic assay of natural pantothenic acid in yeast and liver, influence of clarase digestion[J]. Ind Eng Chem Anal Ed, 1942, 14(7): 603-604.
- [19] NOVELLI G D, KAPLAN N O, LIPMANN F. The liberation of pantothenic acid from coenzyme[J]. J Biol Chem, 1949, 177: 97-107.
- [20] NOVELLI G D, SCHMETZ F J. An improved method for the determination of pantothenic acid in tissues[J]. J Biol Chem, 1951, 192: 181-185.
- [21] MAELAND A, SANDNES K. Determination of biotin in low-temperature fish-meal processed from different species by means of microbiological method using *Lactobacillus plantarum* as test organism[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79: 1298-1300.
- [22] WRIGHT L D, SKEGGS H R. Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1944, 56: 95-98.
- [23] AARONSON S. Biotin assay with a coccus, *Micrococcus sodonensis*, nov. sp.[J]. J Bacteriol, 1955, 69(1): 67.
- [24] AXELROD A E, HOFMANN K. The inactivation of biotin by hydrochloric acid[J]. J Biol Chem, 1950, 187: 23-28.
- [25] LAMPEN J O, BAHLER G P, PETERSON W H. The occurrence of free and bound biotin[J]. J Nutr, 1942, 23: 11-21.
- [26] SCHWEIGERT B S, NIELSEN E, MCLINTIRE J M, et al. Biotin content of meat and meat products[J]. J Nutr, 1943, 26(1): 65-71.
- [27] SCHEINER J, RITTER E D. Biotin content of feedstuffs[J]. J Agric Food Chem, 1975, 23(6): 1157-1162.
- [28] GUILARTE T R, MCLINTYRE P A, TSAN M F. Growth response of the yeasts *Saccharomyces uvarum* and *Kloeckera brevis* to the free biologically active forms of vitamin B₆[J]. J Nutr, 1980, 110(5): 954-958.
- [29] GREGORY J F. Relative activity of the nonphosphorylated B₆ vitamers for *Saccharomyces uvarum* and *Kloeckera brevis* in vitamin B₆ microbiological assay[J]. J Nutr, 1982, 112(8): 1643-1647.
- [30] GUILARTE T R, TSAN M F. Microbiological assays of total vitamin B₆ using the yeasts *Saccharomyces uvarum* and *Kloeckera brevis*[J]. J Nutr, 1983, 113(3): 721-722.
- [31] POLANSKY M M, TOEPFER E W. Vitamin B₆ components in some meats, fish, dairy products, and commercial infant formulas[J]. J Agric Food Chem, 1969, 17(6): 1394-1397.
- [32] ATKIN L, SCHULTZ A S, WILLIAMS W, et al. Yeast microbiological methods for determination of vitamins-pyridoxine[J]. Industrial and Engineering Chemistry, 1943, 15(2): 141-144.
- [33] RABINOWITZ J C, SNELL E E. Extraction procedures for the microbiological determination of vitamin B₆[J]. Analytical Chemistry, 1947, 19(4): 277-280.
- [34] 王为黎, 马景宏, 张旭, 等. 运用微生物法测定保健食品中的维生素 B₆[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(4): 291-295.
- [35] 石丹, 贾云虹, 包怡红, 等. 叶酸检测方法的研究现状及发展趋势[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(3): 42-45.
- [36] ARCOTA J, SHRESTHA A. Folate: methods of analysis[J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16: 253-266.
- [37] MARTIN J, LANDEN J W, SOLIMAN A G, et al. Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1990, 73(5): 805-808.
- [38] de SOUZA S, EITENMILLER R. Effects of different enzyme treatments on extraction of total folate from various foods prior to microbiological assay and radioassay[J]. J Micronutr Anal, 1990, 7: 37-57.
- [39] TAMURA T, MIZUNO Y, JOHNSTON K E, et al. Food folate assay with protease, α -amylase, and folate conjugase treatments[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 135-139.
- [40] RADER J I, WEAVER C M, ANGYAL G. Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products[J]. Food Chemistry, 1998, 62(4): 451-465.
- [41] IWATANI Y, ARCOT J, SHRESTHA A K. Determination of folate contents in some Australian vegetables[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2003, 16: 37-48.

- [42] PANDRANGI S, LABORDE L F. Optimization of microbiological assay of folic acid and determination of folate content in spinach[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39: 525-532.
- [43] HYUN T H, TAMURA T. Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review [J]. Exp Biol Med, 2005, 230(7): 444-454.
- [44] COOK E A, ELLIS L N. Variations in the growth response of four different vitamin B₁₂ Assay microorganisms to the same tissue and standard preparations[J]. Applied Microbiology, 1968, 16(12): 1831-1840.
- [45] MUHAMMAD K, BRIGGS D, JONES G. The appropriateness of using cyanocobalamin as calibration standards in *Lactobacillus leichmanni* ATCC 7830 assay of vitamin B₁₂[J]. Food Chem, 1993, 48: 427-429.
- [46] DAVIS R E, NICOL D J, KELLY A. An automated method for the measurement of folate activity[J]. J Clin Path, 1970, 23: 47-53.
- [47] GROSSOWLCZ N, WAXMAN S, SEHREIBER C. Cryoproteeted *Lactobacillus casei*: an approach to standardization of microbiological assay of folic acid in sorum[J]. Clin Chem, 1981, 27: 745-747.
- [48] WILSON S D, HOME D W. Use of glycerol: cryoprotected *Lactobacillus casei* for microbiological assay of folic acid[J]. Clin Chem, 1982, 28(5): 1198-1200.
- [49] 黎旭茹, 张沁, 刘春丽. 应用自动浊度微生物分析仪测定维生素片剂中的生物素[J]. 广州医药, 2006, 37(6): 58-60.
- [50] 王丽丽, 仪宏, 王瑞果, 等. 微生物生长法检测生物素含量方法的研究[J]. 中国调味品, 2008(2): 58-60.
- [51] 郑巍振, 裴娟萍, 赵春田, 等. 一种简捷的生物素含量测定方法[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(10): 135-137.
- [52] 卢京光, 裴琳, 杨龙华. 在线微生物浊度法测定多维元素片中微量维生素B₁₂的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(9): 1837-1839.
- [53] 廖冰君, 左程丽. B族维生素检测方法及其使用[J]. 食品安全导刊, 2009(8): 40-41.
- [54] 徐文婕, 曲全冈, 刘建蒙. 微生物法检测血浆叶酸实验方法评价及应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(7): 1722-1724.
- [55] 刘志楠, 喻东威, 赵源, 等. 牛奶中泛酸含量测定[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 177-180.