

微生物食物中维生素 B12 的测定方法

微生物测定法

1.原理

维生素 B12 对于 *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 7830) 的正常生长是必需的,在一定生长条件下, *Lactobacillus leichmannii* 的生长与繁殖速度和溶液中维生素 B12 的含量成一定的线性关系,利用浊度法或光密度法测定细菌生长和繁殖的强度可间接地测定食物样品中维生素 B12 的含量。本方法最低检出限 0.001ng。

2.适用范围

本方法参考"Official Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemists"、"Methods of Vitamin Analysis"以及"Methods of the Microbiological Analysis of Selected Nutrients"。本方法适用于测定食物及饲料中的维生素 B12 含量。

3.试剂

本试验所用均为蒸馏水,所用试剂均需分析纯试剂。

3.1 甲苯

3.2 柠檬酸 (C₆H₈O₇·3H₂O)

3.3 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄)

3.4 焦亚硫酸钠 (Na₂S₂O₅)

3.5 抗坏血酸 (生化试剂)

3.6 无水葡萄糖

3.7 无水乙酸钠

3.8 L-胱氨酸 (生化试剂)

3.9 D,L-色氨酸 (生化试剂)

3.10 10mol/L 氢氧化钠溶液:称取 200g 氢氧化钠溶于适量水中,定容至 500ml。

3.11 (1+4) 乙醇溶液:200ml 无水乙醇与 800ml 水充分混匀。

3.12 酸解酪蛋白:称取 50g 不含维生素的酪蛋白于 500ml 烧杯中,加 200 ml 3 mol/L 盐酸,121℃ 高压水解 6 小时。将水解物转移至蒸发皿内,在沸水浴上蒸发至膏状。加 200ml 水使之溶解后再蒸发至膏状,如此反复 3 次,以去除盐酸。以溴酚蓝作外指示剂,用 10mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 3.5。加 20g 活性炭,振荡,过滤,如果滤液不呈淡黄色或无色,可用活性炭重复处理。滤液加水稀释至 500ml,加少许甲苯于冰箱中保存。(该试剂也可从 Difco 公司购得,产品号为 No.0288-15-6。)

? 酸解的目的是为了消除酪蛋白中的维生素,确保基本培养基中不含待测定的维生素 B12,但有时酸水解不一定彻底,所以一定要选用不含维生素的酪蛋白粉 (Sigma 公司),这样可较好地确保酸解酪蛋白中不含维生素 B12。

3.13 腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液:称取硫酸腺嘌呤 (纯度为 98%)、盐酸鸟嘌呤 (生化试剂) 以及尿嘧啶各 0.1g 于 250ml 烧杯中,加 75ml 水和 2ml 浓盐酸,然后加热使其完全溶解,冷却,若有沉淀产生,加盐酸数滴,再加热,如此反复,直至冷却后无沉淀产生为止,以水稀释至 100ml。加少许甲苯于冰箱中保存。

3.14 维生素溶液 I:称取 25mg 核黄素,25mg 盐酸硫胺素,0.25mg 生物素,50mg 尼克酸,用 0.02mol/L 乙酸溶液溶解并定容至 1000ml。

3.15 维生素溶液 II:将 50mg 对氨基苯甲酸,25mg 泛酸钙,100mg 盐酸吡哆醇,100mg 盐酸吡哆醛,20mg 盐酸吡哆胺,5mg 叶酸溶于 (1+4) 乙醇溶液,并定容至 1000ml。

3.16 甲盐溶液:称取 25g KH₂PO₄、25g K₂HPO₄ 溶于 500ml 水中,加 5 滴浓盐酸。

上海洪纪仪器设备有限公司

3.17 乙盐溶液：称取 10g MgSO₄ 7H₂O、0.5g NaCl、0.5g MnSO₄ 4H₂O、0.5g FeSO₄ 7H₂O 溶于水并定容至 500ml，加 5 滴浓盐酸。

3.18 黄嘌呤溶液：称取 1.0g 黄嘌呤溶于 200ml 水中，70℃加热条件下，加入 30ml NH₄OH (2+3) L-天冬酰胺溶于水中，并定容至 100ml。

3.19 吐温 80 溶液：将 25g 吐温-80 溶于乙醇并定容至 250ml。

3.20 维生素 B12 标准溶液（均使用棕色试剂瓶）

(1) 3.20.1 维生素 B12 标准储备溶液 (100ng / ml)：称取 50μg (精度 0.01mg 天平) 维生素 B12 暗红色针状结晶，用 (1+4) 的乙醇溶液定容至 500ml，储存在 2~4℃条件下。

(2) 3.20.2 维生素 B12 标准中间液 (1ng / ml)：取 1ml 储备液用 (1+4) 的乙醇定容至 100ml 贮存于 2~4℃条件下。

(3) 3.20.3 维生素 B12 标准使用液 (0.02 ng / ml)：取 1ml 中间液用水定容至 50ml，用时现配。
? 维生素 B12 见光易分解，因此在配制标准液时要尽量避光，并且一定要使用棕色试剂瓶。

3.21 基本培养基：将下列试剂混合于 500ml 烧杯中，加水至 200ml，以溴甲酚紫作外指示剂，用 10mol/L 氢氧化钠液调节 pH 为 6.0~6.1，用水稀释至 250ml。

酸解酪蛋白 25ml

腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶溶液 5ml

天冬酰胺溶液 5ml

吐温-80 溶液 5ml

甲盐溶液 5ml

乙盐溶液 5ml

维生素溶液 I 5ml

维生素溶液 II 5ml

黄嘌呤溶液 5ml

抗坏血酸 1.0g

L-胱氨酸 0.1g

D,L-色氨酸 0.1g

无水葡萄糖 10.0g

无水乙酸钠 8.3g

该培养基也可从 Difco 公司购得，产品号为 No. 0457-15-1。

? 由于国内某些试剂纯度不够，所以自行配制的培养基较浑浊，严重影响到最后的浊度测定结果，因此建议最好使用进口培养基。

3.22 琼脂培养基：在 600ml 水中，加入 15g 蛋白胨，5g 水溶性酵母提取物干粉，10g 无水葡萄糖，2g 无水磷酸二氢钾，100ml 番茄汁，10ml 吐温-80 溶液，每 500ml 液体培养基加 5.0~7.5g 琼脂，加热溶解，用 10mol/L 氢氧化钠调节 pH 为 6.5~6.8，然后定容至 1000ml，分装于试管中，于 121℃高压灭菌 10 分钟，取出后竖直试管，待冷却至室温后于冰箱保存。

3.23 生理盐水：称取 9.0g 氯化钠溶于 1000ml 水中，。每次使用时分别倒入 2~4 支试管中，每支约加 10ml，塞好棉塞，于 121℃高压灭菌 10 分钟，备用。

3.24 0.4g/L 溴甲酚紫指示剂：称取 0.1g 溴甲酚紫于小研钵内，加 1.6ml 0.1mol/L 氢氧化钠研磨，加少许水继续研磨，直至完全溶解，用水稀释至 250ml。

4. 仪器与设备

4.1 实验室常用设备

4.2 电热恒温培养箱

4.3 压力蒸汽消毒器

4.4 液体快速混合器

上海洪纪仪器设备有限公司

4.5 离心机

4.6 硬质玻璃试管：20mm×150mm

5. 菌种与培养液的制备与保存

5.1 储备菌种的制备：Lactobacillus leichmannii (ATCC 7830) 接种于直面琼脂培养管中，在 $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 16~24 小时，取出后放入冰箱中保存。每周至少传种二次以上。在实验前一天必须传种一次。

? Lactobacillus leichmannii (ATCC 7830) 的生命力不强，每周一定要至少传代 2-3 次，否则极易死亡!

5.2 种子培养液的制备：加 2ml 0.02ng/ml 维生素 B12 标准工作液和 3ml 基本培养基于 10ml 离心管中，塞好棉塞，于 121°C 高压灭菌 10 分钟，取出冷却后于冰箱中保存。每次制备两管，备用。

? 加入离心管中的维生素 B12 标准工作液要适量，过少会阻碍 Lactobacillus Leichmannii 的生长，过多会使零管中的光密度值增大，影响测定结果的准确性。一般 2-3ml 即可。

6. 操作步骤

6.1 接种液的配制：使用前一天，将已在琼脂管中生长 16~24 小时的 L. leichmannii 接种于种子培养液中，在 $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ 培养 16~24 小时，取出后离心 10 分钟 (3000rpm)，弃去上清液，用已灭菌的生理盐水淋洗 2 次，再加入 3ml 灭菌生理盐水，混匀后，将此液倒入已灭菌的注射器中，立即使用。

6.2 水解液的制备：称取 1.3g 无水磷酸二氢钠、1.2g 柠檬酸及 0.1g 焦亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)，溶于水并定容至 100ml，用时现配。

6.3 称取适量样品，至于 100ml 三角瓶中，加 70ml 水解液，混匀，于 121°C 高压灭菌 10 分钟，取出冷却至室温，过滤，然后以溴甲酚紫为外指示剂，用 10mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 为 6.0~6.1，将水解液移至 100ml 容量瓶中，定容至刻度。为保证最后样品测定管中的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的浓度 $\leq 0.03\text{mg/ml}$ ，因此要做适当的稀释。

? 测定管中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的浓度一定要小于 0.03mg/ml，过多会抑制 L. Leichmannii 的生长，因此在称取样品时要考虑到后来的稀释倍数，避免由于稀释倍数过大造成测定管中的维生素 B12 含量过低，无法检出。

? 实验所用的所有试管必须在烤箱中 $180\text{-}200^\circ\text{C}$ 条件下干热灭菌 2-3 小时。

6.4 样品试管的制备：每组平行样品管中分别加入 1.0、2.0、3.0、4.0 ml 样品水解液，并用水稀释至 5ml，然后再加入 5ml 基本液体培养基。

6.5 标准系列管的制备：每组试管中分别加入维生素 B12 标准工作液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml，使每组试管中维生素 B12 的含量为 0.00ng、0.02ng、0.04ng、0.06ng、0.08ng、0.1ng，加水至 5ml，再加入 5 ml 基本液体培养基，需做三组标准曲线。

6.6 灭菌：样品管与标准管均用棉塞塞好，于 121°C 高压灭菌 10 分钟。

? 灭菌时间不宜过长，否则会破坏基本培养基中的营养成分，影响 Lactobacillus Leichmannii 的生长，最好在 5-10 分钟内。

6.7 接种与培养：待试管冷至室温后，每管接一滴种子菌液，于 $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 16~20 小时。

? (1) 接种前，接种室要在紫外灯下消毒至少 30 分钟。(2) 在接种时，其中一支标准系列 0 管可不接种，这样可观察此次实验是否存在污染，并且可消除由于管中液体的颜色造成的误差。

6.8 测定光密度值：于 640nm 波长条件下，以标准系列中零管调节仪器零点，测定样品管液体及标准管液体的光密度值。

? 首先以未接种的标准系列 0 管进行仪器调零，然后在用接种后的标准系列 0 管进行二次调零，之后再测定其他管中液体的光密度值。

上海洪纪仪器设备有限公司

7.结果计算

以维生素 B12 标准系列的不同纳克数为横坐标，光密度值为纵坐标，绘制标准曲线。由样品测定管中的光密度值在曲线上查出相对应的样品测定管中的维生素 B12 含量，再按以下公式计算样品中维生素 B12 含量：

$$X = \frac{c \cdot V \cdot f}{m \times 1000} \times 100$$

式中：

X—样品中维生素 B12 含量， $\mu\text{g}/100\text{g}$ ：

c—测定管中的维生素 B12 含量，ng：

V—样品水解液的定容体积，ml：

f—样品液的稀释倍数

m—样品质量，g。

100/1000 — 单位换算系数

8.注意事项

(1) 全部实验操作应注意避免日光直接照射。

(2) 在人体肠道中，大肠杆菌可以合成维生素 B12，因此，此实验极易被污染，在整个实验中，最重要的是注意清洁问题，确保所用的玻璃器皿、操作环境要清洁。