

食品腐败菌与致病微生物检测中分子印迹技术的应用

张凡

重庆大学 重庆

【摘要】近年来,人们健康意识明显提升,对食品安全问题越来越重视,而在食品供应保障及食品质量安全管理中食品污染、腐败问题一直一来就是重点关注问题。只有快速、准确的对食品微生物进行监测,评估食品污染情况,才能阻止食源性疾病发生,避免食物浪费。分子印迹聚合物检测技术具有性能稳定,特异性高,易制备等优点。在食品腐败菌、致病微生物检测中应用范围比较广。

【关键词】食品腐败菌;致病微生物;分子印迹技术;检测

Application of molecular imprinting technology to detection of food spoilage bacteria and pathogenic microorganisms

Fan Zhang

Chongqing University, Chongqing

【Abstract】In recent years, people's awareness of health has improved significantly, and interest in food safety has increased. In terms of food supply assurance and food quality and safety management, food contamination and spoilage are always attracting attention. Only by rapidly and accurately monitoring food microbes and assessing food contamination can foodborne diseases be prevented and food waste avoided. Molecularly imprinted polymer detection technology has the advantages of stable performance, high specificity, and easy preparation. It has a wide range of applications in the detection of food spoilage and pathogenic microorganisms.

【Keywords】food spoilage bacteria, pathogenic microorganisms, molecular imprinting technology, detection

为控制食品腐败,减少食源性疾病,常用到表面等离子共振、ELISA、菌落计数、细胞培养等食品安全检测技术对食品中微生物污染情况进行检测,但这些检测方法灵敏度、特异性较差,且检测时间长,操作复杂。近年来,随着现代检测技术不断发展,分子印迹技术广泛应用于食品腐败菌、致病微生物检测,该检测技术通过分子印迹聚合物疏水作用力、静电作用力、范德华力、氢键作用力等分子间作用力及三维空间结构识别模板分子及其结构类似物特异性,对使用有害微生物进行检测,从而确保食物安全。

1 微生物分子印迹聚合物合成分析

1.1 乳液聚合

乳液聚合也就是让水相中模板分子和稳定剂经过搅拌后演变为乳液,这是一种制备生物大分子分

子印迹聚合物方式,通过乳液聚合法进行制备聚合时蛋白等生物大分子模板构象稳定性更高,且生物大分子分子印迹聚合物在目标物识别特异性方面更高。研究发现^[1],选用铜绿假单胞菌细胞壁中多糖作为模板分子,功能单体、交联剂分别选择丙烯酰胺和N,N-亚甲基双丙烯酰胺,在乳液聚合原理中,三者都能在蒸馏水中融合形成水相分散相和油相磺基琥珀酸钠二辛酯正己烷为连续相、聚氧乙烯月桂醚,N,N,N,N-四甲基乙二胺及过硫酸铵制备时可以将选择性识别铜绿假单胞菌作为分子印迹聚合物^[2]。

稳定剂为胶体粒子的乳液也就是Pickering乳液,制备时无需表面活性剂,目前,Pickering乳液已经UAN广泛应用在大分子分子印迹聚合物制备。研究表明^[3],细菌修饰为乙烯基N-丙烯酸壳聚糖的

粒子稳定剂,水相中油相乳液要想提升其稳定性,就必须由自由基引发交联剂单体油相聚合,从而使细菌在聚合时在聚合物微球表面印迹。当细菌被洗脱后,模板细菌在聚合物微球表面留下吸附位点^[4]。

1.2 电化学聚合法

电化学聚合法主要是在电解质溶液例放入电极,借助电化学还原、氧化反应,促使交联剂、功能单体、模板分子在电极表面产生聚合反应,从而实现大分子分子印迹聚合物制备。这种制备方法操作更加简单,能更好的控制聚合物膜厚度^[5]。

1.3 微接触印迹法

细菌微接触印迹法是一种整细胞印迹方法,在印迹膜和细菌模板制备是一般分为以下步骤:(1)制备细菌模板。使用去离子水、无水乙醇清洗显微镜玻璃载玻片,再将其浸泡于酸性食人鱼溶液1小时,副溶血弧菌悬浮液经过福尔马林进行灭活后在玻璃片上均匀涂抹,置于4°C环境中半小时,使载玻片表面细菌进行沉降,再把载玻片放到旋转涂布机进行离心处理,每分钟1500r,将多余溶剂去除,制备细菌模板^[6-7]。(2)制备印迹膜。真空条件下,在环己烷中混合聚二甲基硅氧烷,在干净玻璃载玻片放上适量混合物,置于80°C热板2分钟进行预固化,从而提升预聚物黏度,往预聚合物中压入细菌模板玻璃片,维持正常室温,过夜后再将其置于80°C热板1小时进行固化,使用去离子水超声对压印膜进行清洗,干燥^[8-9]。却达到印迹膜非特异性吸附,可以选择蒸发-沉积法完成副溶血弧菌氟化聚二甲基硅氧烷印迹膜制备,从而提升选择吸附特性和捕获率^[10]。

2 检测方法

2.1 荧光检测法

荧光检测法主要是借助荧光信号强弱及颜色深浅完成定性、定量分析,这种检测方法操作简便,敏感度高,响应速度快,在食品检测中应用比较频繁。研究发现^[11],当乳液稳定剂选用分散在磷酸盐溶液中单增李斯特菌的复合物和CdTe量子点,引发剂选用N,N-二甲基苯胺、以过氧化苯甲酰、二乙烯基苯为功能单体及三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯,通过Pickering乳液聚合完成细菌荧光探针制备,可以有效提升探针特异性,当目标细菌吸附量变大时,荧光强度随之下降,在单增李斯特菌中探针检出限达到103CFU/mL,能有效检出牛奶污染情况

[12]。

2.2 电化学传感器检测法

受环境影响,芽孢杆菌孢子可能出现长时间休眠情况,萌发后又会在营养体中重新进行生长,从而导致食物腐败,引发食源性疾病^[13]。而电化学聚合法可以让蜡样芽孢杆菌芽孢大分子分子印迹聚合物出现在碳糊工作电极表面,在循环伏安法电化学传感器检测时,电极、孢子孵育5分钟后,能快速对蜡样芽孢杆菌污染情况进行检测^[14]。如以革兰氏阴性无芽孢细菌大肠杆菌为例,这种病原菌多在食品及饮用水中均比较常见,是诱发肠胃炎常见因素,模板为大肠杆菌O157:H7,功能单体为多巴胺,经过电化学方法可在玻璃电极表面直接合成大分子分子印迹聚合物膜^[15],在目标细菌印迹膜吸附特异性方面比较高,和大肠杆菌多克隆抗体进行结合,则会形成H7-pAb-N-GQDs复合物,在K2S2O8条件下,借助电化学发光增加目标细菌吸附,提高发光强度,大肠杆菌O157:H7电化学发光检测范围甚至可以达到101~107CFU/mL^[16]。

2.3 共振光散射检测法

共振光散射检测法主要是借助散射频率、电子吸收电磁波频率,促进电子共振,从而增强吸收光能量,产生散射,这种检测方法操作方便,检测速度快,灵敏度高,可以有效检测出甲型肝炎病毒等食源性病毒及危害物残留检测,通过共振光散射检测法能有效阻止大规模疾病发生^[7]。

2.4 表面等离子共振检测法

表面等离子共振检测法是在金属介质波导表面等离子无标记、无损伤形成的一种检测技术,这种检测技术仅需少量样品就可以完成检测,不仅操作方便快捷,灵敏度高,且还能实现实时监测^[8]。如肠球菌属粪肠球菌,是食物中常见粪便污染菌,也是导致人畜共患致病菌主要病菌,而表面等离子共振检测在大肠杆菌中检测限可以达到0.57CFU/mL,有效检测出粪肠球菌。

3 结论

全球食品工业均面临着食品污染、腐败问题,这也是各国食品供应保障、食品质量安全管理关注的重点问题。据相关资料统计显示,全球每年食源性疾病发病人数达到6亿人次,每年食源性疾病死亡人数达到42人人,25%食品损失和微生物腐败有着密切关系。食物细菌污染不仅给生产者造成巨

大经济损失,且给社会环境造成不良影响。分子印迹技术是一种特异识别性能合成材料技术,能高效识别微生物、生物大分子,及时检出食品中微生物污染情况,既能避免食物浪费,还能阻止食源性疾病爆发,对保障人类健康具有重大价值,在未来应进一步推广食品腐败菌与致病微生物分子印迹检测技术,从而提升食品安全。

参考文献

- [1] 任涛涛,陈金媛,靳雨婷,等.分子印迹技术在食品腐败菌与致病微生物检测中的应用[J].中国食品学报,2022,22(6):435-444.
- [2] Jalilsood T, Baradaran A, Song A A L, et al. Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming *Lactobacillus* isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 1-14.
- [3] Raposo A, Pérez E, de Faria C T, et al. Food spoilage by *Pseudomonas* spp.—An overview[J]. *Foodborne pathogens and antibiotic resistance*, 2016: 41-71.
- [4] 都炳强,张志毅,赵晓磊,等.分子印迹光子晶体技术在食品检测中的应用研究进展[J].轻工学报,2020,35(6):16-26.
- [5] OZGUR, ERDOGAN. Artificial Carbonic Anhydrase via the Molecular Imprinting Approach for Carbon Dioxide Bioconversion[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*,2021,60(24):8714-8719.
- [6] 徐武,付含,陈贵堂.分子印迹技术用于食品中真菌毒素样品前处理的研究进展[J].生物加工过程,2020, 18(4): 417-424.
- [7] ZHANG JINGBIN, WANG YIXIANG, LU XIAONAN. Molecular imprinting technology for sensing foodborne pathogenic bacteria[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,2021,413(18):4581-4598.
- [8] 许祯毅,吴玉琼,范俐,等.分子印迹技术在食品安全检测领域的应用进展[J].食品研究与开发,2021,42(3):207-212.
- [9] 武转玲.基于分子印迹技术的生鲜食品化学污染物残留监测研究[J].河北北方学院学报(自然科学版), 2021, 37(3):15-19,26.
- [10] KALOGIOURI, NATASA P., PRITSA, AGATHI, KABIR, ABUZAR, et al. A green molecular imprinted solid-phase extraction protocol for bisphenol A monitoring with HPLC-UV to guarantee the quality and safety of walnuts under different storage conditions[J]. *Journal of separation science*.,2021,44(8):1633-1640.
- [11] Duffy G. *Molecular Technologies for the Detection and Characterisation of FoodBorne Pathogens*[M]//*Advances in Food Diagnostics*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017: 187-203.
- [12] Umesha S, Manukumar H M. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(1): 84-104.
- [13] Hameed S, Xie L, Ying Y. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 81: 61-73.
- [14] El-Sayed A, Awad W, Abdou N E, et al. Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens[J]. *International journal of veterinary science and medicine*, 2017, 5(2): 89-97.
- [15] Singhal N, Kumar M, Kanaujia P K, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis[J]. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 791.
- [16] KALOGIOURI, NATASA P., PRITSA, AGATHI, KABIR, ABUZAR, et al. A green molecular imprinted solid-phase extraction protocol for bisphenol A monitoring with HPLC-UV to guarantee the quality and safety of walnuts under different storage conditions[J]. *Journal of separation science*.,2021,44(8):1633-1640.

收稿日期: 2022 年 10 月 24 日

出刊日期: 2022 年 12 月 8 日

引用本文: 张凡, 食品腐败菌与致病微生物检测中分子印迹技术的应用[J]. 细胞与分子生物学研究, 2022, 2(1): 11-13.

DOI: 10.12208/j.ijcmbr.20220003

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网(CNKI Scholar)、万方数据(WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS