



流式在食品行业的应用



VISUALIZE
the possibilities.

 **BECKMAN
COULTER**
Life Sciences

目录

第一章 流式在食品安全快速检测中的应用	1
第一节 食品中病原性致病菌的测定	1
第二节 牛奶中体细胞的快速检测	3
第二章 流式在食品发酵过程中的应用	4
第一节 苹果酸 - 乳酸发酵在酿酒过程中的应用	4
第二节 发酵在线模型的建立	5
第三章 流式在保健品中的应用	6
第一节 保健食品毒理学评价	6
第二节 保健食品的功能性评价	7
第四章 流式在转基因食品中的应用	8
第五章 食品中的分选应用	9
第一节 工业酿酒酵母筛选	9
第二节 奶牛育种 - 精子分选	9

流式在食品行业的应用

第一章 流式在食品安全快速检测中的应用

第一节 食品中病原性致病菌的测定

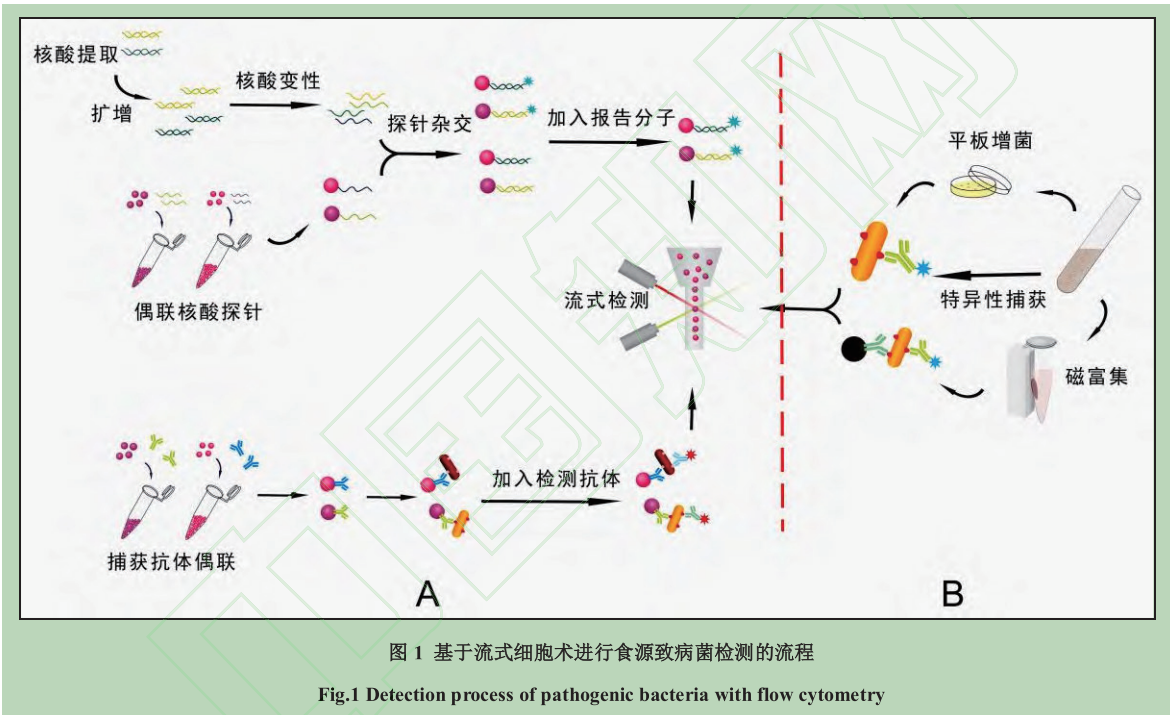
目前，流式细胞术以其高速、高灵敏度已经广泛应用于食品中各种病原性致病菌的快速检测，尤其是食品中的大肠杆菌的检测已经被 FDA 列为食品安全的常规检测，其流式检测方法已收录于 Current Protocol Cytometry. 2001 May;Chapter 11 中（Flow cytometric detection of pathogenic E. coli in food）。

文章:

流式细胞术在食源致病菌检测中应用的研究进展
(李萍, 温平威等. 《食品工业科技》2013 年 第 14 期)

流式细胞仪检测食源致病菌的原理:

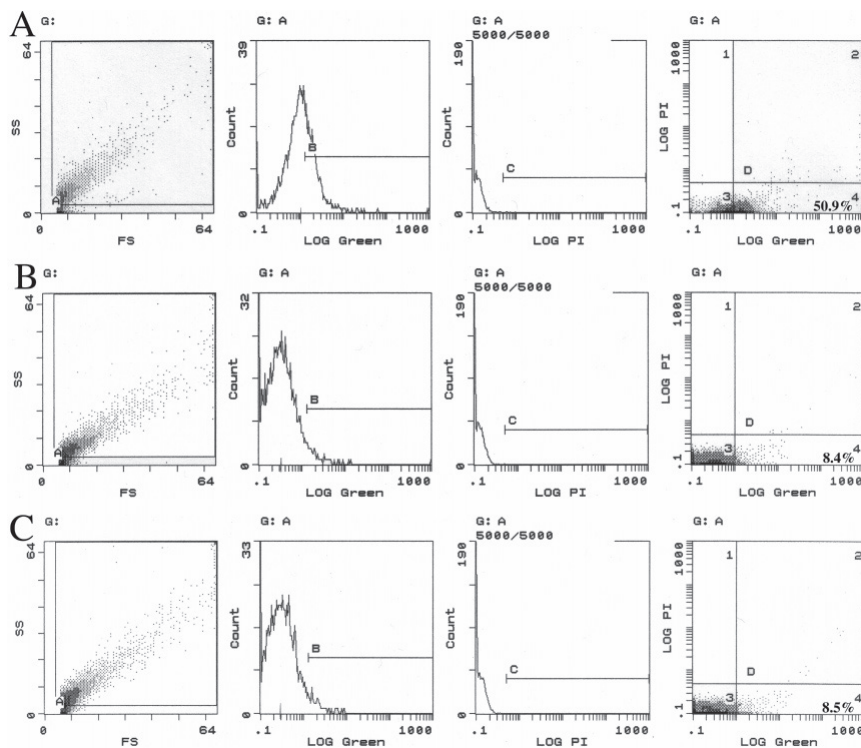
流式细胞仪在检测食源致病菌时主要以全菌为对象，其一般检测过程如图 1（B）所示，待测样品中的细菌一般要经过增菌或富集后再进行检测，增菌的过程一般通过液体培养基培养来实现，而富集可通过免疫磁富集法来实现。经过增菌或富集后的细菌与标记有荧光的抗体混合，充分反应后用流式细胞仪直接进行检测。若样品不需要增菌或富集，则可直接与标记有荧光的抗体反应后进行检测。检测过程中，样品中的细菌在鞘液的带动下，以单个细胞的方式依次通过激光检测口，检测到的光散射信号和荧光信号最后被转换成为数字信号并由计算机输出。



文章:

Flow Cytometric Analysis To Detect Pathogens in Bacterial Cell Mixtures Using Semiconductor Quantum Dots
(Megan A. Hahn, Peter C. Keng and Todd D. Krauss. Anal. Chem. 2008, 80, 864-872)

Quantum dots 为一种新型的荧光染料，具有荧光强度高、发射光谱窄，不容易串色等优点，本文利用 Coulter EPICS 流式细胞仪对混合的细菌群（致病性 E. coli O157:H7 和无害型 E. coli DH5r）进行检测，对比了 FITC 和 QDS 之间的区别。



图示

A 为 1×QD 标记的细胞。

B 为 1×FITC 标记的细胞。

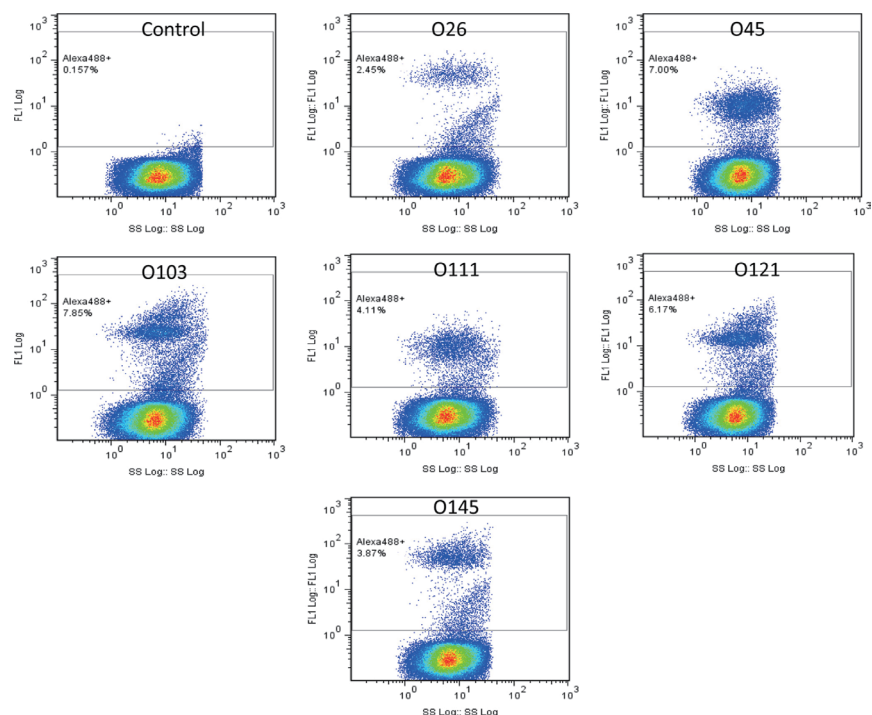
C 为 10×FITC 标记的细胞。

文章:

Rapid Detection of the Top Six Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O Groups in Ground Beef by Flow Cytometry

(Narasimha V. Hegde, Bhushan M. Jayarao, and Chitrita DebRoy. Journal of Clinical Microbiology. 2012,6, 2137-2139)

产志贺毒素大肠杆菌 (Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, STEC) 指可产生志贺毒素 (shiga toxin) 的大肠杆菌, 是重要的人畜共患病病原菌之一。目前大约有 250 种产志贺毒素大肠杆菌, 可将其分为 O157 STEC 和 non-O157 STEC 两类。由于大肠杆菌 O157 : H7 致病力强, 发病率高, 因此受到了广泛的关注。然而, 近年来, 关于 non-O157 STEC, 尤其是 “the Big Six” 暴发流行的报道逐渐增多。据统计, 在美国由 non-O157 STEC 引起的患病病例中, 有 71% 是由 O26、O45、O103、O111、O121、O145 血清型引起的。为了保障人类的健康和牛肉市场的正常供应, 2011 年 9 月, 美国农业部颁布了一项禁止出售带有大肠杆菌 “the Big Six” (O26、O45、O103、O111、O121、O145) 牛肉制品的法令。



图示为牛肉中 STEC O 的流式检测图, 细菌富集 8h 后进行检测, 图中方框里为每 100000 个细胞中 Alexa Fluor 488 阳性的比例。

本文利用 Beckman Coulter 公司的 FC500 对 6 种不同的血清型进行测定。

第二节 牛奶中体细胞的快速检测

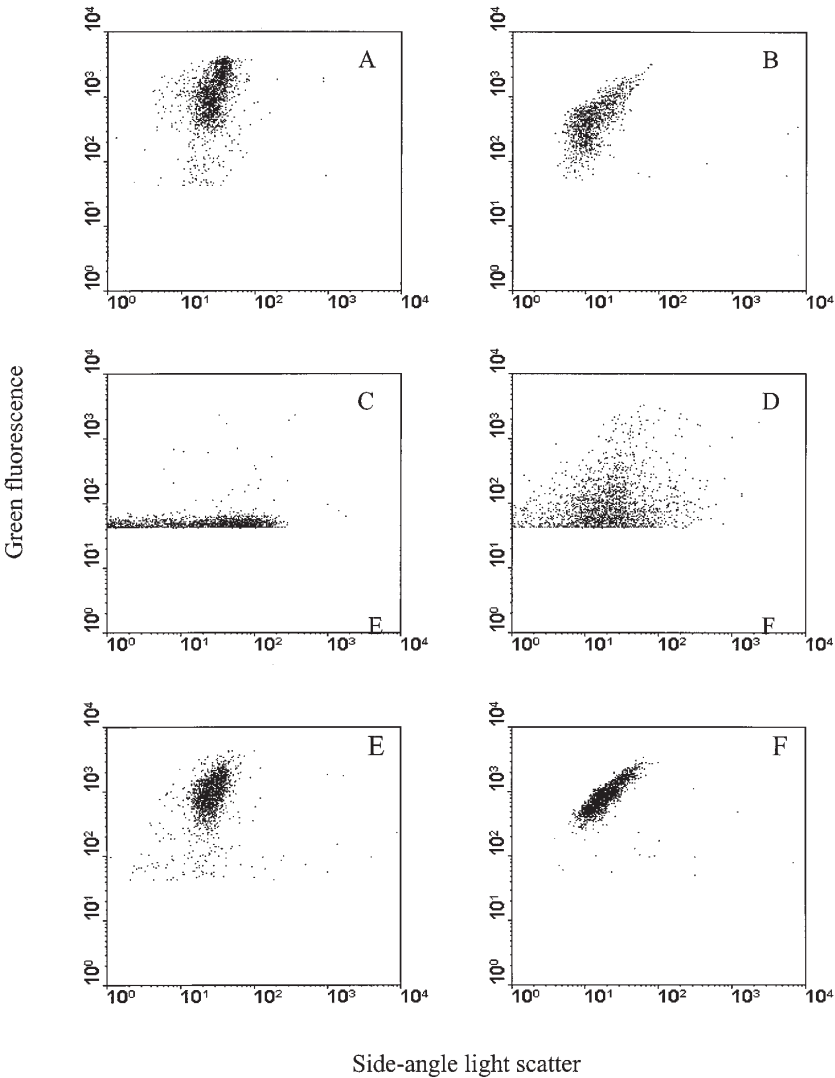
流式细胞计数具有高度的敏感性，可同时对目的菌进行定量和定性的检测。目前，牛奶中体细胞计数被作为决定奶牛是否健康其牛奶是否安全的一项重要指标。很多国家已经将其列为评价牛奶是否安全的重要检测项目。

文章:

A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk.
(Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. Appl Environ Microbiol. 2000 Mar;66(3):1228-32)

2000 年，澳大利亚麦夸里大学的 S.Gunasekera 等实现了用流式细胞术快速检测牛奶中的菌落总数，解决了牛奶中蛋白质和脂类颗粒对流式细胞计数影响的问题，建立了基于清除牛奶中酶的应用流式细胞术快速检测牛奶中菌落总数的方法。

图示为牛奶中细菌的检测。A .E. coli 在 PBS 中； B. S. aureus 在 PBS 中； C. 未处理的牛奶加 E. coli； D. 无脂奶加 E. coli； E. 牛奶加 E. coli 去脂并经蛋白酶处理； F. 牛奶加 S. aureus 去脂并经蛋白酶处理。



第二章 流式在食品发酵过程中的应用

流式细胞术可以快速、准确地检测出食品中的细菌，可应用于啤酒、葡萄酒、苹果酒酿造行业和面包发酵等行业酵母菌的检测，包括啤酒里存活的细菌数量，发酵液和发酵产品中细菌总数、活菌数目和死菌数目，追踪监测稳定生长期生成的酿酒酵母菌变化，测定胞内物含量来监测产品生产和储存过程中的质量变化。

第一节 苹果酸-乳酸发酵在酿酒过程中的应用

苹果酸 - 乳酸发酵对葡萄酒品质有着严重影响，而其与乳酸菌的发酵特性，生长条件有关，若苹果酸 - 乳酸发酵纯正则可有效提高酒的品质，否则引起酒的病害。纯正的发酵可以使得苹果酸在苹果酸乳酸酶的作用下催化为乳酸和 CO₂，起到降酸作用同时修饰风味，酯的合成和分解可增加果香、奶香，乳酸菌还可引起多糖的释放，减少低粗糙度或涩味的感觉。实际的酿酒过程中苹果酸 - 乳酸发酵很难控制，所以酿酒厂大都采用直接添加乳酸菌进行苹果酸 - 乳酸发酵，这样可以更好的控制发酵开始的时间及进程增加果香和香气的复杂性，使其口感柔和。

文章:

Taking advantage of the flow cytometry technique for improving malolactic starters production
(Covadonga Quirós · Mónica Herrero ,et.al.Eur Food Res Technol (2009) 228:543-552)

在发酵过程中，经常用乳酸菌作为发酵剂，而其高的细胞存活率 and 功能性直接收到保存技术的影响，包括处理过程和后续的贮存和再水化。本文通过 FC500 进行了死活细胞的区分和酶活性（Chem Chrome 6）的检测。

图示 a 和 c 是对照峰图。b 是 CV6 (Chem Chrome 6) 酶活单信号图, G 是对数期细胞 CV6 的荧光信号, H 是灭活后的荧光信号。d 是 PI 染色看死活细胞的流式图, Y 代表对数期细胞, Z 代表灭活后的细胞。

文章:

Use of Flow Cytometry To Follow the Physiological States of Microorganisms in Cider Fermentation Processes

(Mo'nica Herrero, Covadonga Quiro's,et.al.
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,
Oct. 2006, p. 6725-6733)

本文通过流式细胞仪 FC500 进行检测以了解苹果酒发酵过程中的微生物生长状态。

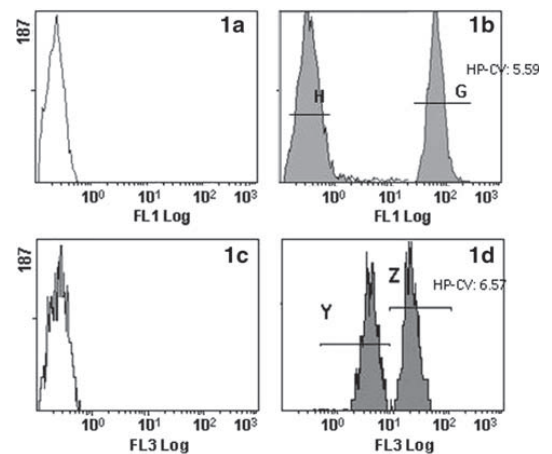


Fig. 1 Histograms of FC controls. a and c, Unstained samples analysis. b Illustrates CV6 fluorescence signal of growing cells at exponential phase (G), while heat-killed cells showed no green fluorescence (H) (overlaid histograms). d PI-stained cells from controls at exponential growth phase (Y) and heat-killed cells (Z), clearly distinguished by red fluorescence intensities detected in FL3 (overlaid histograms)

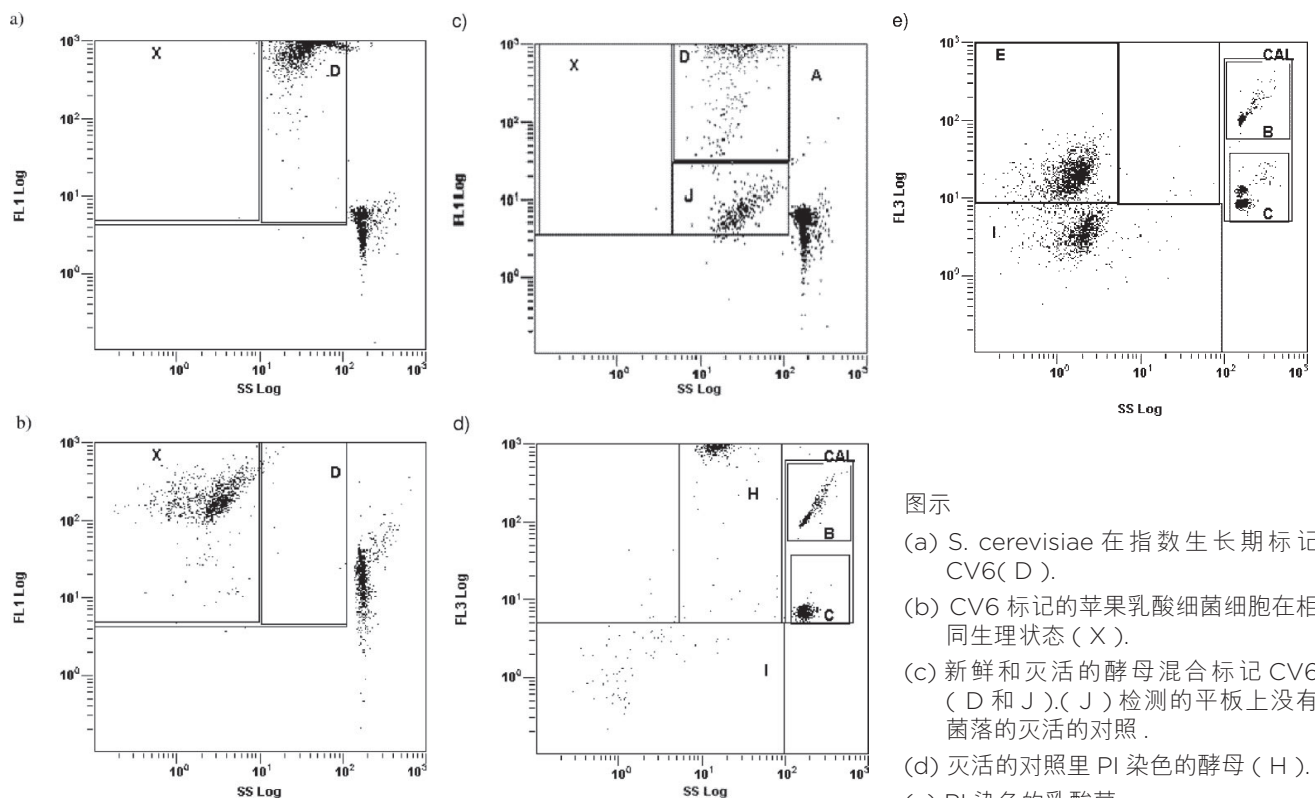


FIG. 2. Pure cultures. (a) *S. cerevisiae* at mid-exponential phase stained by CV6 (D). (b) CV6-stained malolactic bacterial cells at the same physiological stage (X). (c) Mixtures containing fresh and heat-killed yeast stained by CV6 (D and J). The lower subpopulation (J) was detected in heat-killed controls without colonies on plates. (d) PI-stained yeast in heat-killed controls (H). (e) Malolactic bacteria stained by PI showing two distinct subpopulations with different fluorescence intensities (E and I) (corresponding to the micrograph in Fig. 3c).

图示

- (a) *S. cerevisiae* 在指数生长期标记 CV6 (D)。
- (b) CV6 标记的苹果乳酸菌细胞在相同生理状态 (X)。
- (c) 新鲜和灭活的酵母混合标记 CV6 (D 和 J)。(J) 检测的平板上没有菌落的灭活的对照。
- (d) 灭活的对照里 PI 染色的酵母 (H)。
- (e) PI 染色的乳酸菌。

第二节 发酵在线模型的建立

发酵过程由于涉及到许多物理和化学的变化, 其相互之间的作用和影响必然造成生物过程的响应速度慢、在线测量带有大幅时间滞后的特性。为了解决这一问题, 往往会建立相应发酵的数学模型, 即通过测量的化学值和相应的红外光谱值之间建立有效的数学模型, 以期达到快速的在线监控和预测的效果。

文章:

Artificial Neural Network Study of Whole-Cell Bacterial Bioreporter Response Determined Using Fluorescence Flow Cytometry

(Sirisha Busam et.al. Anal. Chem. 2007, 79, 9107-9114)

本文通过 Beckman Coulter 公司的流式细胞仪 Moflo 对发酵过程中的指标进行了检测, 并通过人工神经网络对发酵过程进行了模型的建立, 实现发酵过程的在线监控。

第三章 流式在保健品中的应用

第一节 保健食品毒理学评价

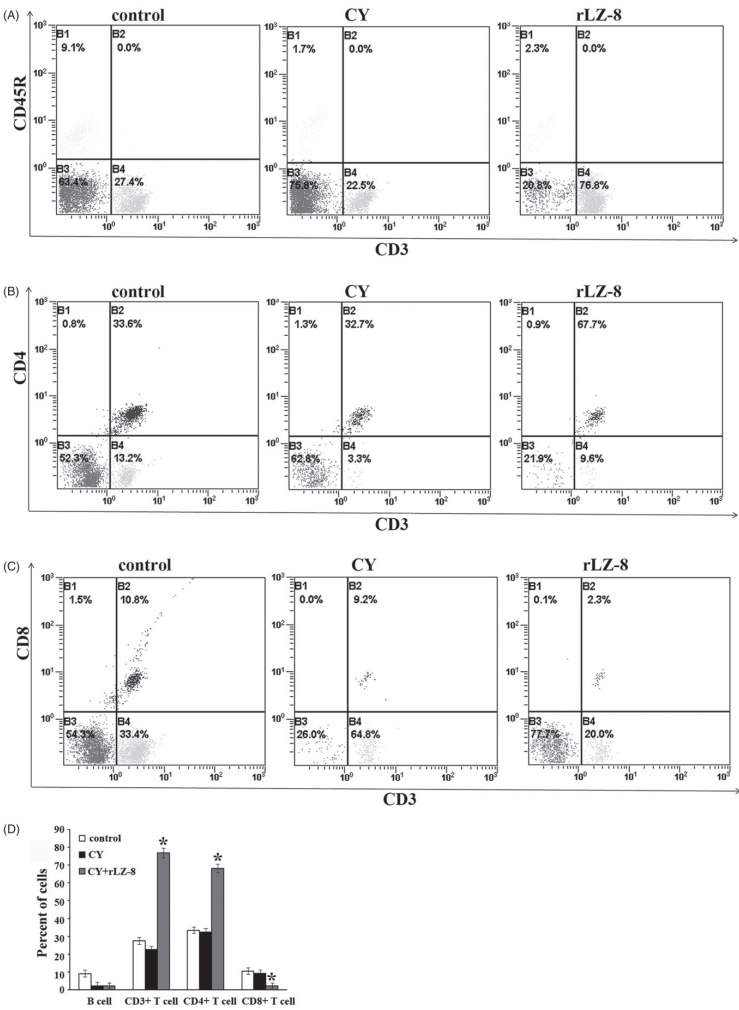
国家 GB15193-2003 《食品安全性毒理学评价程序和方法》中对我国食品安全性毒理学评价实验分为四个阶段和内容。第一阶段：急性毒性试验；第二阶段：遗传毒性试验，传统致畸试验，30 天喂养试验；第三阶段：亚慢性毒性试验——90 天喂养试验、繁殖试验、代谢试验；第四阶段：慢性毒性试验（包括致癌试验）。目前，流式广泛应用于各种动物毒性试验中。

文章:

Effect of recombinant Ganoderma lucidum immunoregulatory protein on cyclophosphamide-induced leukopenia in mice

(Hui Zhou et.al. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2013; 35(3): 426-433)

本文通过 Beckman Coulter 公司的 FC500 对重组灵芝调节蛋白喂食的小鼠的外周血中的免疫细胞进行了测定。



图示：rLZ-8（重组灵芝免疫调节蛋白）对 B 和 T 细胞的影响。

- (A) B 细胞和 CD3+T 细胞；
- (B) CD4+T 细胞；
- (C) CD8+T 细胞；
- (D) 细胞比例。Control：正常未处理组。

CY：生理盐水加 CY(环磷酰胺) 组

Figure 7. Effect of rLZ-8 administration on B and T cells. (A) B cells and CD3⁺ T cells. (B) CD4⁺ T cells. (C) CD8⁺ T cells. (D) Percent of cells. Control: normal untreated group. CY: normal saline plus CY-treated group. CY + rLZ-8: rLZ-8 160 μg/kg plus CY-treated group. Data are expressed as means ± SD. *p value represents a significant difference compared to the CY group at *p < 0.05.

第二节 保健食品的功能性评价

近年来，流式细胞术广泛应用于保健食品增强免疫力功能检测和评价的研究，例如小鼠服用保健食品后与未服用的对照比较，检测外周血淋巴细胞计数、T 细胞、NK 细胞检测以及小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能等来评价保健品对小鼠免疫能力的增强。2003 版卫生部发布的《保健食品功能学评价程序和检验方法》中已经明确保健食品的功能性评价方法和基本要求。

文章:

The differential immunological activities of Ganoderma lucidum on human pre-cancerous uroepithelial cells

(J.W.M. Yuen et.al. Journal of Ethnopharmacology 135 (2011) 711-718)

灵芝作为一种食用真菌，具有抗癌、抗氧化等功效，目前广泛被制成保健品，深收大家的喜爱。本文研究了灵芝的不同的提取方法（水提和醇提）对 HUC-PC 细胞免疫活性的影响。通过 Beckman Coulter 公司的流式细胞仪 FC500 检测了 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 等 15 种细胞因子以及相关的凋亡情况。

第四章 流式在转基因食品中的应用

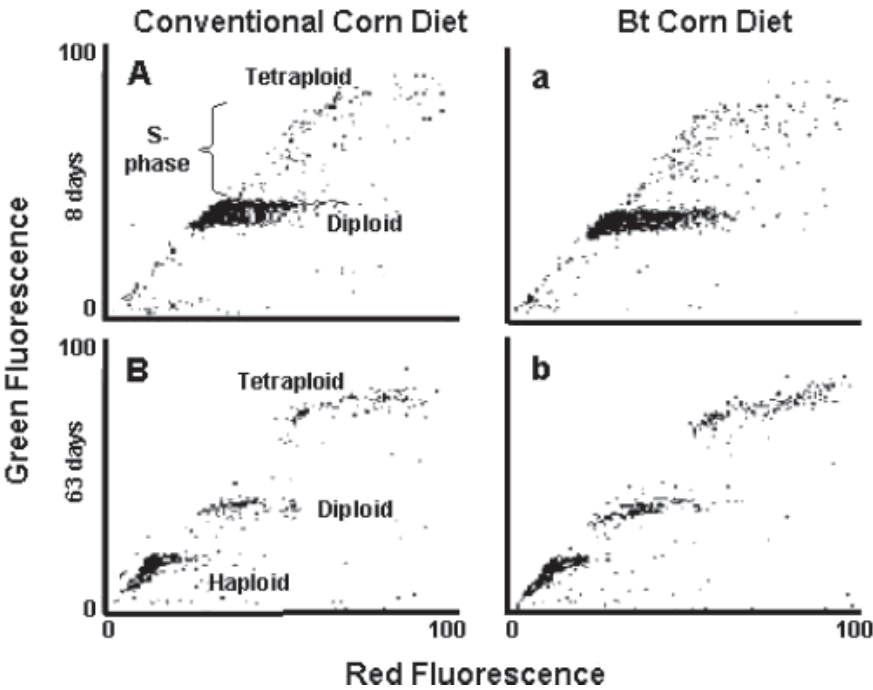
转基因食品主要是通过基因工程技术将外源基因插入作物的基因组中，从而改变遗传特性，其可以大幅度提高产量，保证粮食自给，减轻贫困和饥饿，同时减少杀虫剂的使用，保护环境。但目前其还存在很多争议，外源基因的安全性收到了大家广泛的质疑，因此转基因食品的安全性，尤其是其毒理学评价尤为重要。目前一般在动物试验的基础上进行遗传毒性试验（精子畸形试验），30天-90天喂养试验，繁殖试验等。

文章:

Evaluation of Bt (*Bacillus thuringiensis*) Corn on Mouse Testicular Development by Dual Parameter Flow Cytometry

(DENISE G. BRAKE et.al. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 2097-2102)

本文通过小鼠模型研究了转基因抗虫玉米（苏云金杆菌）的毒理性。通过给雌鼠在怀孕期和哺乳期分别喂食转基因玉米和正常玉米。传代雄鼠断奶后，仍然进行两种不同玉米的喂食。出生后 8,16,26,32,63,87 天分别用 Beckman Coulter 公司的流式细胞仪 Cicero 对小鼠的生殖细胞进行检测。



图示
A, a 为出生 8 天的小鼠，A 为正常玉米组，
a 为转基因玉米组；
B, b 为第四代 63 天的小鼠，B 为正常玉米
组，b 为转基因玉米组；
图中单倍体细胞占了睾丸细胞的 80%。

Figure 1. Green vs red fluorescence cytograms of 2000 acridine orange stained testicular cells from 8 day old mice fed (A) a conventional corn-fed and (a) a Bt corn diet. Most cells at this stage of growth are diploid (center population). Cytograms B and b are from 63 day old mice of the 4th generation of the multigenerational study. Haploid cells comprise approximately 80% of all testicular cells in both the conventional and the Bt diets. The 8 and 63 day old mice were presented together so that the reader could visualize the typical adult testicular profile after measuring the cells as described above.

第五章 食品中的分选应用

第一节 工业酿酒酵母筛选

酿酒酵母是发酵工业的重要微生物，主要用于酒精、啤酒和面包工业的发酵。传统的酿酒酵母的选育方法主要是自然筛选、诱变育种和杂交育种，但这些方法专一性不强，且容易复性。目前，利用基因工程技术定向构建基因工程菌已经成为了菌株选育的重要方法。流式分选技术也广泛的应用于优势菌株的筛选中。

文章:

Directed Evolution of a Secretary Leader for the Improved Expression of Heterologous Proteins and Full-Length Antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*

(J. Andy Rakestraw et.al. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 103, No. 6, August 15, 2009)

本文利用 Beckman Coulter 公司的流式细胞分选仪 Moflo 对能增强单链抗体分泌的突变菌株进行了筛选，其最优菌株相对于原始野生型提高了 16 倍。

第二节 奶牛育种-精子分选

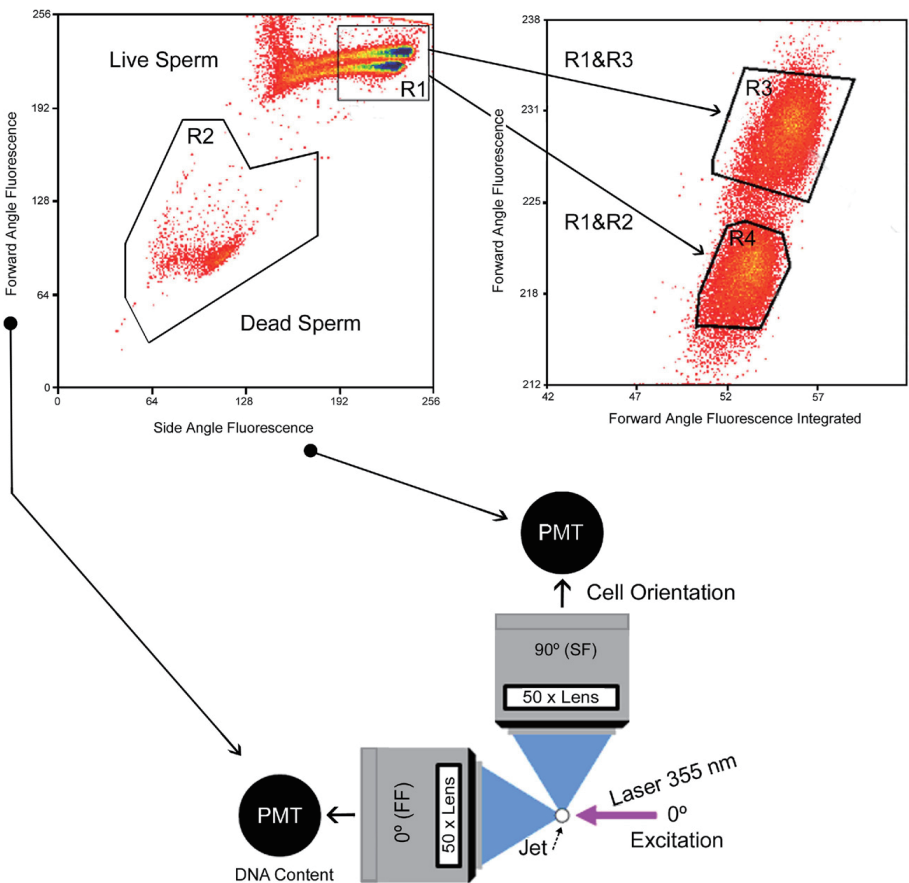
目前，流式分选技术已广泛运用于奶牛的选育中，通过分选技术分选 X 精子能大大增加奶牛的扩繁速度，提高经济效益。

文章:

Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features

(J. Gosálvez et.al. Theriogenology 75 (2011) 197-205)

本文利用 Beckman Coulter 公司的流式细胞分选仪 Moflo SX 研究了精子分选过程中 DNA 的断裂情况。建立了精子分选的一整套方案。



图示
R1 为活细胞;
R2 为死细胞;
R3 为 X 染色体;
R4 为 Y 染色体。

Fig. 1. Illustration of live (R1) and dead (R2) sperm cell populations further separated into X- (R3) and Y-chromosome (R4) bearing sperm cell populations using forward angle fluorescence for detecting DNA content and side angle fluorescence for detecting sperm cell orientation (R3 and R4 are gated on R1). Boolean sort logic is as follows: sorting region (R) for X-chromosome bearing sperm cells = R1 and R3 and not R2, while sorting region for Y-chromosome bearing sperm cells = R1 and R4 and not R2.



www.beckmancoulter.cn
apls@beckman.com



官方微信



手机官网

贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司

全国产品咨询热线: 400 821 8899

全国售后服务热线: 400 885 5355 / 800 820 5355

上海	北京	广州	杭州	福州	成都	昆明
021-3865 1000	010-6521 3000	020-8518 7188	0571-8767 8208	0591-8850 5800	028-8621 0135	0871-6361 7528
南京	武汉	西安	济南	郑州	沈阳	哈尔滨
025-6667 6033	027-8823 2300	029-8833 7440	0531-8096 5011	0371-5563 7430	024-3195 8690	0451-5555 0637

© 2015 Beckman Coulter Commercial Enterprise (China) Co., Ltd

PRINTED IN CHINA