



中华人民共和国国家标准

GB 4789.35—2016

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳酸菌检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 4789.35—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》、SN/T 1941.1—2007《进出口食品中乳酸菌检验方法 第1部分:分离与计数方法》。

本标准与 GB 4789.35—2010 相比,主要变化如下:

- 增加了乳酸菌总数计数培养条件的选择及结果说明;
- 修改了改良 MRS 培养基成分;
- 修改了平板计数的接种方法和接种量。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳酸菌检验

1 范围

本标准规定了含乳酸菌食品中乳酸菌(lactic acid bacteria)的检验方法。
本标准适用于含活性乳酸菌的食品中乳酸菌的检验。

2 术语和定义

2.1

乳酸菌 **lactic acid bacteria**

一类可发酵糖主要产生大量乳酸的细菌的通称。本标准中乳酸菌主要为乳杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和嗜热链球菌属(*Streptococcus*)。

3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 3.1 恒温培养箱:36℃±1℃。
- 3.2 冰箱:2℃~5℃。
- 3.3 均质器及无菌均质袋、均质杯或灭菌乳钵。
- 3.4 天平:感量0.01g。
- 3.5 无菌试管:18mm×180mm、15mm×100mm。
- 3.6 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 3.7 无菌锥形瓶:500mL、250mL。

4 培养基和试剂

- 4.1 生理盐水:见A.1。
- 4.2 MRS(Man Rogosa Sharpe)培养基及莫匹罗星锂盐(Li-Mupirocin)和半胱氨酸盐酸盐(Cysteine Hydrochloride)改良MRS培养基:见A.2和A.3。
- 4.3 MC培养基(Modified Chalmers培养基):见A.4。
- 4.4 0.5%蔗糖发酵管:见A.5。
- 4.4 0.5%纤维二糖发酵管:见A.5。
- 4.6 0.5%麦芽糖发酵管:见A.5。
- 4.7 0.5%甘露醇发酵管:见A.5。
- 4.8 0.5%水杨苷发酵管:见A.5。
- 4.9 0.5%山梨醇发酵管:见A.5。
- 4.10 0.5%乳糖发酵管:见A.5。

- 4.11 七叶苷发酵管:见 A.6。
 4.12 革兰氏染色液:见 A.7。
 4.13 莫匹罗星锂盐(Li-Mupirocin):化学纯。
 4.14 半胱氨酸盐酸盐(Cysteine Hydrochloride):纯度 $>99\%$ 。

5 检验程序

乳酸菌检验程序见图 1。

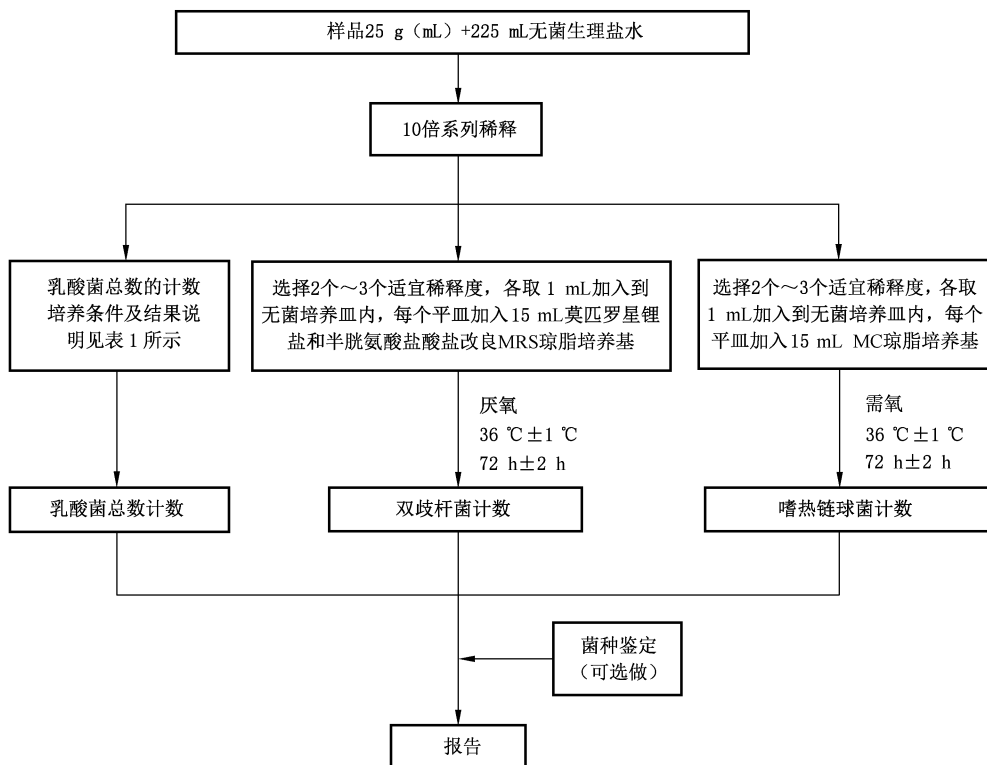


图 1 乳酸菌检验程序图

6 操作步骤

6.1 样品制备

6.1.1 样品的全部制备过程均应遵循无菌操作程序。

6.1.2 冷冻样品可先使其在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下解冻, 时间不超过 18 h, 也可在温度不超过 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下解冻, 时间不超过 15 min。

6.1.3 固体和半固体食品: 以无菌操作称取 25 g 样品, 置于装有 225 mL 生理盐水的无菌均质杯内, 于 $8\ 000\ \text{r}/\text{min}\sim 10\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 均质 1 min~2 min, 制成 1:10 样品匀液; 或置于 225 mL 生理盐水的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 1 min~2 min 制成 1:10 的样品匀液。

6.1.4 液体样品: 液体样品应先将其充分摇匀后以无菌吸管吸取样品 25 mL 放入装有 225 mL 生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中, 充分振摇, 制成 1:10 的样品匀液。

6.2 步骤

6.2.1 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1 : 10 样品匀液 1 mL,沿管壁缓慢注于装有 9 mL 生理盐水的无菌试管中(注意吸管尖端不要触及稀释液),振摇试管或换用 1 支无菌吸管反复吹打使其混合均匀,制成 1 : 100 的样品匀液。

6.2.2 另取 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸头,按上述操作顺序,做 10 倍递增样品匀液,每递增稀释一次,即换用 1 次 1 mL 灭菌吸管或吸头。

6.2.3 乳酸菌计数

6.2.3.1 乳酸菌总数

乳酸菌总数计数培养条件的选择及结果说明见表 1。

表 1 乳酸菌总数计数培养条件的选择及结果说明

样品中所包括乳酸菌菌属	培养条件的选择及结果说明
仅包括双歧杆菌属	按 GB 4789.34 的规定执行
仅包括乳杆菌属	按照 6.2.3.4 操作。结果即为乳杆菌属总数
仅包括嗜热链球菌	按照 6.2.3.3 操作。结果即为嗜热链球菌总数
同时包括双歧杆菌属和乳杆菌属	1) 按照 6.2.3.4 操作。结果即为乳酸菌总数; 2) 如需单独计数双歧杆菌属数目,按照 6.2.3.2 操作
同时包括双歧杆菌属和嗜热链球菌	1) 按照 6.2.3.2 和 6.2.3.3 操作,二者结果之和即为乳酸菌总数; 2) 如需单独计数双歧杆菌属数目,按照 6.2.3.2 操作
同时包括乳杆菌属和嗜热链球菌	1) 按照 6.2.3.3 和 6.2.3.4 操作,二者结果之和即为乳酸菌总数; 2) 6.2.3.3 结果为嗜热链球菌总数; 3) 6.2.3.4 结果为乳杆菌属总数
同时包括双歧杆菌属,乳杆菌属和嗜热链球菌	1) 按照 6.2.3.3 和 6.2.3.4 操作,二者结果之和即为乳酸菌总数; 2) 如需单独计数双歧杆菌属数目,按照 6.2.3.2 操作

6.2.3.2 双歧杆菌计数

根据对待检样品双歧杆菌含量的估计,选择 2 个~3 个连续的适宜稀释度,每个稀释度吸取 1 mL 样品匀液于灭菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。稀释液移入平皿后,将冷却至 48 °C 的莫匹罗星锂盐和半胱氨酸盐酸盐改良的 MRS 培养基倾注入平皿约 15 mL,转动平皿使混合均匀。36 °C ± 1 °C 厌氧培养 72 h ± 2 h,培养后计数平板上的所有菌落数。从样品稀释到平板倾注要求在 15 min 内完成。

6.2.3.3 嗜热链球菌计数

根据待检样品嗜热链球菌活菌数的估计,选择 2 个~3 个连续的适宜稀释度,每个稀释度吸取 1 mL 样品匀液于灭菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。稀释液移入平皿后,将冷却至 48 °C 的 MC 培养基倾注入平皿约 15 mL,转动平皿使混合均匀。36 °C ± 1 °C 需氧培养 72 h ± 2 h,培养后计数。嗜热链球菌在 MC 琼脂平板上的菌落特征为:菌落中等偏小,边缘整齐光滑的红色菌落,直径 2 mm ± 1 mm,菌落背面为粉红色。从样品稀释到平板倾注要求在 15 min 内完成。

6.2.3.4 乳杆菌计数

根据待检样品活菌总数的估计,选择 2 个~3 个连续的适宜稀释度,每个稀释度吸取 1 mL 样品匀液于灭菌平皿内,每个稀释度做两个平皿。稀释液移入平皿后,将冷却至 48 °C 的 MRS 琼脂培养基倾注入平皿约 15 mL,转动平皿使混合均匀。36 °C ± 1 °C 厌氧培养 72 h ± 2 h。从样品稀释到平板倾注要求在 15 min 内完成。

6.3 菌落计数

注：可用肉眼观察，必要时用放大镜或菌落计数器，记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

6.3.1 选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30 CFU 的平板记录具体菌落数，大于 300 CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。

6.3.2 其中一个平板有较大片状菌落生长时，则不宜采用，而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数；若片状菌落不到平板的一半，而其余一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘以 2，代表一个平板菌落数。

6.3.3 当平板上出现菌落间无明显界线的链状生长时，则将每条单链作为一个菌落计数。

6.4 结果的表述

6.4.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内，计算两个平板菌落数的平均值，再将平均值乘以相应稀释倍数，作为每克或每毫升中菌落总数结果。

6.4.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，按式(1)计算：

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

N —— 样品中菌落数；

$\sum C$ —— 平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和；

n_1 —— 第一稀释度(低稀释倍数)平板个数；

n_2 —— 第二稀释度(高稀释倍数)平板个数；

d —— 稀释因子(第一稀释度)。

6.4.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 300 CFU，则对稀释度最高的平板进行计数，其他平板可记录为多不可计，结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。

6.4.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于 30 CFU，则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

6.4.5 若所有稀释度(包括液体样品原液)平板均无菌落生长，则以小于 1 乘以最低稀释倍数计算。

6.4.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 30 CFU~300 CFU 之间，其中一部分小于 30 CFU 或大于 300 CFU 时，则以最接近 30 CFU 或 300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

6.5 菌落数的报告

6.5.1 菌落数小于 100 CFU 时，按“四舍五入”原则修约，以整数报告。

6.5.2 菌落数大于或等于 100 CFU 时，第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后，取前 2 位数字，后面用 0 代替位数；也可用 10 的指数形式来表示，按“四舍五入”原则修约后，采用两位有效数字。

6.5.3 称重取样以 CFU/g 为单位报告，体积取样以 CFU/mL 为单位报告。

7 结果与报告

根据菌落计数结果出具报告，报告单位以 CFU/g(mL)表示。

8 乳酸菌的鉴定(可选做)

8.1 纯培养

挑取 3 个或以上单个菌落,嗜热链球菌接种于 MC 琼脂平板,乳杆菌属接种于 MRS 琼脂平板,置 36 ℃±1 ℃厌氧培养 48 h。

8.2 鉴定

8.2.1 双歧杆菌的鉴定按 GB 4789.34 的规定操作。

8.2.2 涂片镜检:乳杆菌属菌体形态多样,呈长杆状、弯曲杆状或短杆状。无芽胞,革兰氏染色阳性。嗜热链球菌菌体呈球形或球杆状,直径为 0.5 μm~2.0 μm,成对或成链排列,无芽胞,革兰氏染色阳性。

8.2.3 乳酸菌菌种主要生化反应见表 2 和表 3。

表 2 常见乳杆菌属内种的碳水化合物反应

菌种	七叶苷	纤维二糖	麦芽糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	蔗糖	棉子糖
干酪乳杆菌干酪亚种(<i>L.casei</i> subsp. <i>casei</i>)	+	+	+	+	+	+	+	-
德氏乳杆菌保加利亚种(<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
嗜酸乳杆菌(<i>L.acidophilus</i>)	+	+	+	-	+	-	+	d
罗伊氏乳杆菌(<i>L.reuteri</i>)	ND	-	+	-	-	-	+	+
鼠李糖乳杆菌(<i>L.rhamnosus</i>)	+	+	+	+	+	+	+	-
植物乳杆菌(<i>L.plantarum</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+

注: +表示 90%以上菌株阳性;-表示 90%以上菌株阴性;d 表示 11%~89%菌株阳性;ND 表示未测定。

表 3 嗜热链球菌的主要生化反应

菌种	菊糖	乳糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	马尿酸	七叶苷
嗜热链球菌(<i>S.thermophilus</i>)	-	+	-	-	-	-	-

注: +表示 90%以上菌株阳性;-表示 90%以上菌株阴性。

附录 A 培养基及试剂

A.1 生理盐水

A.1.1 成分

NaCl	8.5 g
------	-------

A.1.2 制法

将上述成分加入到 1 000 mL 蒸馏水中,加热溶解,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A.2 MRS 培养基

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	5.0 g
酵母粉	4.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温 80	1.0 mL
$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	2.0 g
醋酸钠 $\cdot 3H_2O$	5.0 g
柠檬酸三铵	2.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.05 g
琼脂粉	15.0 g

A.2.2 制法

将上述成分加入到 1 000 mL 蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至 6.2 ± 0.2 ,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A.3 莫匹罗星锂盐和半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 培养基

A.3.1 莫匹罗星锂盐储备液制备:称取 50 mg 莫匹罗星锂盐加入到 50 mL 蒸馏水中,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

A.3.2 半胱氨酸盐酸盐储备液制备:称取 250 mg 半胱氨酸盐酸盐加入到 50 mL 蒸馏水中,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

A.3.3 制法

将 A.2.1 成分加入到 950 mL 蒸馏水中,加热溶解,调节 pH,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热熔化琼脂,在水浴中冷至 48 °C,用带有 0.22 μm 微孔滤膜的注射器将莫匹罗星锂盐储备液及半胱氨酸盐酸盐储备液制备加入到熔化琼脂中,使培养基中莫匹罗星锂盐的浓度为 50 $\mu g/mL$,半胱

氨基酸酸盐的浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

A.4 MC 培养基

A.4.1 成分

大豆蛋白胨	5.0 g
牛肉粉	3.0 g
酵母粉	3.0 g
葡萄糖	20.0 g
乳糖	20.0 g
碳酸钙	10.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
1%中性红溶液	5.0 mL

A.4.2 制法

将前面 7 种成分加入蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至 6.0 ± 0.2 ,加入中性红溶液。分装后 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min~20 min。

A.5 乳酸杆菌糖发酵管

A.5.1 基础成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
吐温 80	0.5 mL
琼脂	1.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

按 0.5%加入所需糖类,并分装小试管, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min~20 min。

A.6 七叶苷培养基

A.6.1 成分

蛋白胨	5.0 g
磷酸氢二钾	1.0 g
七叶苷	3.0 g
枸橼酸铁	0.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 mL
蒸馏水	100 mL

A.6.2 制法

将上述成分加入蒸馏水中,加热溶解,121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A.7 革兰氏染色液

A.7.1 结晶紫染色液

A.7.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

A.7.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.7.2 革兰氏碘液

A.7.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

A.7.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.7.3 沙黄复染液

A.7.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

A.7.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.7.4 染色法

A.7.4.1 将涂片在酒精灯火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。

A.7.4.2 滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。

A.7.4.3 滴加 95%乙醇脱色,约 15 s~30 s,直至染色液被洗掉,不要过分脱色,水洗。

A.7.4.4 滴加复染液,复染 1 min。水洗、待干、镜检。