

中华人民共和国国家标准

GB/T 4789.34—2008
代替 GB/T 4789.34—2003

食品卫生微生物学检验 双歧杆菌检验

Microbiological examination of food hygiene—
Examination of *Bifidobacterium*

2008-12-03 发布

2009-03-01 实施



中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.34—2003《食品卫生微生物学检验 双歧杆菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.34—2003 相比主要修改如下：

——将选择性分离培养基由 TPY 和 BL 培养基修改为 BBL 培养基(改良番茄汁琼脂培养基)；

——增加 API 50CH 诊断试剂盒；

——增加果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶(F6PPK)测定。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由中华人民共和国卫生部负责解释。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准主要起草人：徐进、刘秀梅、杨宝兰、李志刚、杨大进、方从容。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 4789.34—1996、GB/T 4789.34—2003。

食品卫生微生物学检验

双歧杆菌检验

1 范围

本标准规定了食品中双歧杆菌的检验方法。

本标准适用于食品中双歧杆菌的检验。

2 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。

- 2.1 恒温培养箱:36℃±1℃。
- 2.2 气相色谱仪配 FID 检测器。
- 2.3 冰箱:2℃~5℃。
- 2.4 天平:感量 0.1 g。
- 2.5 无菌试管:18 mm×180 mm、15 mm×100 mm。
- 2.6 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器(200 μL~1 000 μL)及配套吸头。
- 2.7 无菌锥形瓶:500 mL、250 mL。

3 培养基和试剂

- 3.1 BBL 培养基:见第 A.1 章。
- 3.2 PYG 培养基:见第 A.2 章。
- 3.3 TPY 培养基:见第 A.3 章。
- 3.4 API 50CH 生化鉴定试剂盒¹⁾。
- 3.5 半胱氨酸:化学纯。
- 3.6 氟化钠:化学纯。
- 3.7 碘乙酸钠或碘乙酸钾:化学纯。
- 3.8 果糖-6-磷酸盐:化学纯。
- 3.9 盐酸羟胺(hydroxy lamine-HCl):化学纯。
- 3.10 三氯乙酸(TCA):化学纯。
- 3.11 三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$):化学纯。
- 3.12 甲醇:分析纯。
- 3.13 三氯甲烷:分析纯。
- 3.14 硫酸:分析纯。
- 3.15 冰乙酸:分析纯。
- 3.16 乳酸:分析纯。
- 3.17 乙酸标准溶液:吸取分析纯冰乙酸 5.7 mL,移入 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,标定,标定方法见 B.2.2.1,此溶液浓度约为 1 mol/L。

1) 由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

3.18 乙酸标准使用液：将经标定的乙酸标准溶液用水稀释至 0.01 mol/L。

3.19 乳酸标准溶液：吸取分析纯乳酸 8.4 mL，移入 100 mL 容量瓶中，加水至刻度，标定，标定方法见 B.2.2.3，此溶液浓度约为 1 mol/L。

3.20 乳酸标准使用液：将经标定的乳酸标准溶液用水稀释至 0.01 mol/L。

4 检验程序

双歧杆菌检验程序见图 1。

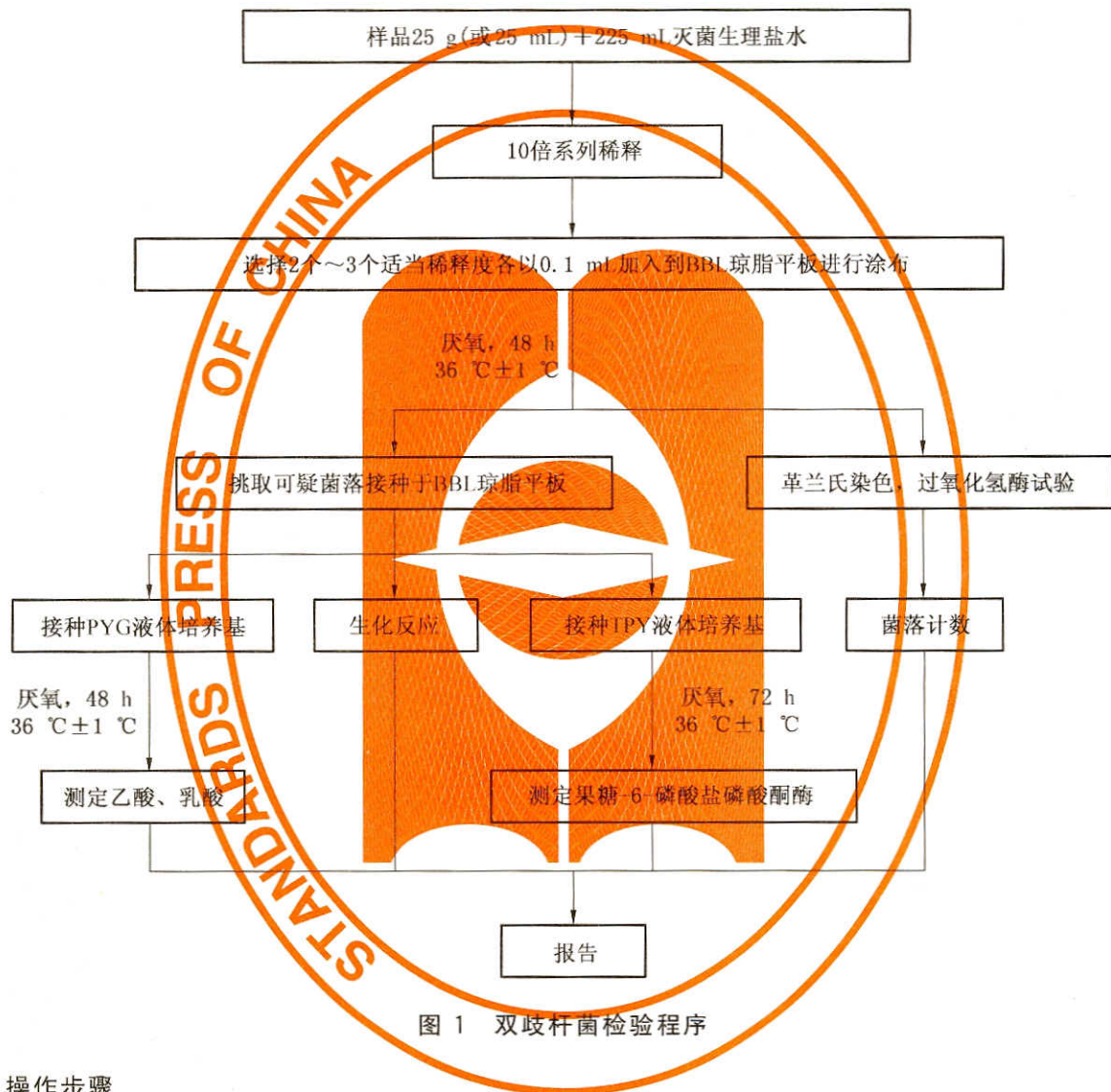


图 1 双歧杆菌检验程序

5 操作步骤

5.1 样品制备

5.1.1 样品的全部制备过程均应遵循无菌操作程序。

5.1.2 以无菌操作称取 25 g(或 25 mL)样品，置于装有 225 mL 生理盐水的灭菌锥形瓶内，制成 1 : 10 的样品匀液。

5.2 稀释步骤

5.2.1 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1 : 10 样品匀液 1.0 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。

5.2.2 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。

5.2.3 根据对待检样品双歧杆菌含量的估计,选择三个连续的适宜稀释度,每个稀释度吸取 0.1 mL 稀释液于 BBL 琼脂平板,使用灭菌 L 形棒进行表面涂布,每个稀释度做两个平板。厌氧,36 °C ± 1 °C 培养 48 h ± 2 h,培养后选取菌落数在 30~300 之间的平板进行计数。从样品稀释到平板涂布要求在 15 min 内完成。

5.3 纯培养

挑取 3 个或以上的可疑菌落接种于 BBL 琼脂平板,厌氧,36 °C ± 1 °C 培养 48 h。

5.4 镜检及生化鉴定

5.4.1 涂片镜检:双歧杆菌菌体为革兰氏染色阳性,不抗酸、无芽孢,无动力,菌体形态多样,呈短杆状、纤细杆状或球形,可形成各种分支或分叉形态。

5.4.2 API 50CH 生化鉴定试剂盒鉴定:选取纯培养平板上的三个单个菌落,分别使用 API 50CH 生化鉴定试剂盒进行生化反应检测,不同双歧杆菌菌种主要生化反应见表 1。

表 1 双歧杆菌菌种主要生化反应

编号	项 目	两歧双歧杆菌 (<i>B. bifidum</i>)	婴儿双歧杆菌 (<i>B. infantis</i>)	长双歧杆菌 (<i>B. longum</i>)	青春双歧杆菌 (<i>B. adolescentis</i>)	动物双歧杆菌 (<i>B. animalis</i>)	短双歧杆菌 (<i>B. breve</i>)
1	甘油	—	—	—	—	—	—
2	赤藓醇	—	—	—	—	—	—
3	D-阿拉伯糖	—	—	—	—	—	—
4	L-阿拉伯糖	—	—	+	+	+	—
5	D-核糖	—	—	—	+	+	+
6	D-木糖	—	+	+	d	+	+
7	L-木糖	—	—	—	—	—	—
8	阿东醇	—	—	—	—	—	—
9	β-甲基-D-木糖醇	—	—	—	—	—	—
10	D-半乳糖	d	+	+	+	d	+
11	D-葡萄糖	—	+	+	+	+	+
12	D-果糖	d	+	+	d	d	+
13	D-甘露糖	—	+	+	—	—	—
14	L-山梨糖	—	—	—	—	—	—
15	L-鼠李糖	—	—	—	—	—	—
16	卫矛醇	—	—	—	—	—	—
17	肌醇	—	—	—	—	—	+
18	甘露醇	—	—	—	—	—	—
19	山梨醇	—	—	—	—	—	—
20	α-甲基-D-甘露糖	—	—	—	—	—	—

表 1 (续)

编号	项 目	两歧双歧杆菌 (<i>B. bifidum</i>)	婴儿双歧杆菌 (<i>B. infantis</i>)	长双歧杆菌 (<i>B. longum</i>)	青春双歧杆菌 (<i>B. adolescentis</i>)	动物双歧杆菌 (<i>B. animalis</i>)	短双歧杆菌 (<i>B. breve</i>)
21	α-甲基-D-葡萄糖	—	—	+	—	—	—
22	N-乙酰-葡萄糖胺	—	—	—	—	—	+
23	苦杏仁甙(扁桃甙)	—	—	—	+	+	—
24	熊果甙	—	—	—	—	—	—
25	七叶灵	—	—	+	+	+	—
26	水杨甙(柳醇)	—	+	—	+	+	—
27	D-纤维二糖	—	+	—	d	—	—
28	D-麦芽糖	—	+	+	+	+	+
29	D-乳糖	+	+	+	+	+	+
30	D-蜜二糖	—	+	+	+	+	+
31	D-蔗糖	—	+	+	+	+	+
32	D-海藻糖(覃糖)	—	—	—	—	—	—
33	菊糖(菊根粉)	—	—	—	—	—	—
34	D-松三糖	—	—	+	+	—	—
35	D-棉籽糖	—	+	+	+	+	+
36	淀 粉	—	—	—	+	—	—
37	肝糖(糖原)	—	—	—	—	—	—
38	木糖醇	—	—	—	—	—	—
39	龙胆二糖	—	+	—	+	+	+
40	D-松二糖	—	—	—	—	—	—
41	D-来苏糖	—	—	—	—	—	—
42	D-塔格糖	—	—	—	—	—	—
43	D-岩糖	—	—	—	—	—	—
44	L-岩糖	—	—	—	—	—	—
45	D-阿糖醇	—	—	—	—	—	—
46	L-阿糖醇	—	—	—	—	—	—
47	葡萄糖酸钠	—	—	—	+	—	—
48	2-酮基-葡萄糖酸钠	—	—	—	—	—	—
49	5-酮基-葡萄糖酸钠	—	—	—	—	—	—

注：+表示 90% 以上菌株阳性；—表示 90% 以上菌株阴性；d 表示 11%~89% 以上菌株阳性。

- 5.5 果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶(F6PPK)的测定,见第 B.1 章。
- 5.6 气相色谱法测定双歧杆菌的有机酸代谢产物,见第 B.2 章。

6 报告

根据 5.4 镜检及生化反应结果、5.5 果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶(F6PPK)阳性结果和 5.6 双歧杆菌的有机酸代谢产物乙酸与乳酸微摩尔之比大于 1,报告双歧杆菌属的种名。

附 录 A
(规范性附录)
培 养 基

A.1 BBL 琼脂培养基

A.1.1 成分

蛋白胨	15.0 g
酵母浸膏	2.0 g
葡萄糖	20.0 g
可溶性淀粉	0.5 g
氯化钠	5.0 g
西红柿浸出液	400 mL
吐温 80	1.0 mL
肝粉	0.3 g
琼脂粉	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

A.1.2.1 半胱氨酸盐溶液的配制:称取半胱氨酸 0.5 g,加入 1.0 mL 盐酸,使半胱氨酸全部溶解,配制成半胱氨酸盐溶液。

A.1.2.2 西红柿浸出液的制备:将新鲜的西红柿洗净后称重切碎,加等量的蒸馏水在 100 °C 水浴中加热,搅拌 90 min,然后用纱布过滤,校正 pH7.0,将浸出液分装后,121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A.1.2.3 将 A.1.1 所有成分加入蒸馏水中,加热溶解,然后加入半胱氨酸盐溶液,校正 pH6.8±0.2。分装后 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热融化琼脂,冷至 50 °C 时使用。

A.2 PYG 液体培养基

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	2.5 g
酵母粉	5.0 g
半胱氨酸-HCl	0.25 g
盐溶液	20.0 mL
维生素 K ₁ 溶液	0.5 mL
氯化血红素溶液(5 mg/mL)	2.5 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

A.2.2.1 盐溶液的配制:称取无水氯化钙 0.2 g、硫酸镁 0.2 g、磷酸氢二钾 1.0 g、磷酸二氢钾 1.0 g、碳酸氢钠 10.0 g、氯化钠 2.0 g,加蒸馏水至 1 000 mL。

A.2.2.2 氯化血红素溶液(5 mg/mL)的配制:称取氯化血红素 0.5 g 溶于 1 mol/L 氢氧化钠 1.0 mL 中,加蒸馏水至 1 000 mL,121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A.2.2.3 维生素 K₁ 溶液的配制:称取维生素 K₁ 1.0 g,加无水乙醇 99 mL,过滤除菌,冷藏保存。

A.2.2.4 除氯化血红素溶液和维生素 K₁ 溶液外,A.2.1 其余成分加入蒸馏水中,加热溶解,校正

pH6.0,加入中性红溶液。分装后 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热融化琼脂,加入氯化血红素溶液和维生素 K₁ 溶液,冷至 50 °C 使用。

A.3 TPY 液体培养基

A.3.1 成分

水解酪蛋白	10.0 g
植物朊	5.0 g
酵母粉	2.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	2.0 g
氯化镁(MgCl ₂ ·6H ₂ O)	0.5 g
硫酸锌(ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	0.25 g
氯化钙(CaCl ₂)	0.15 g
氯化铁(FeCl ₃)	0.1 mg
吐温-80	1.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

A.3.2.1 半胱氨酸盐溶液的配制:称取半胱氨酸 0.5 g,加入 1.0 mL 盐酸,使半胱氨酸全部溶解,配制成半胱氨酸盐溶液。

A.3.2.2 将 A.3.1 成分加热溶解,然后加入半胱氨酸盐溶液,校正 pH6.5±0.1,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。



附录 B

(规范性附录)

果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶与双歧杆菌的有机酸代谢产物检测方法

B.1 果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶(F6PPK)测定

B.1.1 试剂

- 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.5)+500 mg/L 半胱氨酸-HCl。
- 6 mg/mL 氟化钠+10 mg/mL 碘乙酸钠或钾。
- 果糖-6-磷酸盐(钠盐,70%~98%纯度)80 mg/mL 水溶液。
- 盐酸羟胺(hydroxy lamine-HCl) 139 mg/mL 水溶液,使用时以氢氧化钠中和至 pH6.5。
- 15 g/100 mL 三氯乙酸(TCA) 水溶液。
- 4 mol/L 盐酸。
- 0.5 g/100 mL 氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)溶于 0.1 mol/L 盐酸中。

B.1.2 检测步骤

挑取 BBL 琼脂平板上纯培养的双歧杆菌接种到 TPY 液体培养基,厌氧,36℃±1℃ 培养 72 h±3 h。取 10 mL TPY 培养液于 3 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,细胞用上述试剂 a)洗涤 2 次,然后悬浮于 1.0 mL 试剂 a)中。将盛有细胞悬液的容器置于一冰浴内,用超声波处理 20 min,以破碎细胞。然后在超声波处理物中加入试剂 b)和试剂 c)各 0.25 mL,置于 37℃ 保温 30 min。保温后在溶液中加入 1.5 mL 试剂 d),置室温 5 min。加入试剂 e)和试剂 f)各 1 mL,置室温 5 min。然后加入 1 mL 试剂 g)观察溶液颜色。

B.1.3 结果判定

经以上程序测定如显红褐色或红紫色,则果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶为阳性,否则为阴性。

B.2 气相色谱法测定双歧杆菌的有机酸代谢产物

B.2.1 双歧杆菌培养液制备

挑取 BBL 琼脂平板上纯培养的双歧杆菌接种于 PYG 液体培养基,同时用未接种菌的 PYG 液体培养基做空白对照,厌氧,36℃±1℃ 培养 48h。

B.2.2 标准液的配制

B.2.2.1 乙酸标准溶液:准确吸取乙酸 5.70 mL,加水稀释至 100.0 mL,摇匀,进行标定,配成约 1.0 mol/L 的乙酸标准溶液。标定方法为:准确称取乙酸 3 g,加水 15 mL,酚酞指示液 2 滴,用 1 mol/mL 氢氧化钠溶液滴定,并将滴定结果用空白试验校正。1 mL 1 mol/mL 氢氧化钠溶液相当于 60.05 mg 的乙酸。

B.2.2.2 乙酸使用液:将经标定的乙酸标准溶液用水稀释至 20.0 mmol/L。

B.2.2.3 乳酸标准溶液:准确吸取含量为 85%~90%的乳酸 0.84 mL,加水稀释至 100.0 mL,摇匀,配成 1.0 mol/L 的乳酸标准溶液。标定方法为:准确称取乳酸 1 g,加水 50 mL,加入 1 mol/mL 氢氧化钠滴定液 25 mL,煮沸 5 min,加入酚酞指示液 2 滴,同时用 0.5 mol/mL 硫酸滴定液滴定,并将滴定结果用空白试验校正。1 mL 1 mol/mL 氢氧化钠溶液相当于 90.08 mg 的乳酸。

B.2.2.4 乳酸使用液:将乳酸标准溶液用水稀释至 20.0 mmol/L。

B.2.3 方法

B.2.3.1 乙酸的处理

取双歧杆菌培养液 2.0 mL~3.0 mL 放入 10 mL 离心管中,加入 0.2 mL 50%(体积分数)硫酸溶

液,混匀,加入 2.0 mL 丙酮,混匀后加过量氯化钠,剧烈振摇 1 min,再加入 2.0 mL 乙醚,振摇 1 min 后,于 3 000 r/min 离心 5 min,将上清液转入另一试管中,下层溶液用 2.0 mL 丙酮和 2.0 mL 乙醚重复提取 2 次,合并有机相,于 40 °C 水浴中用氮气吹至少量溶液存在,用丙酮定容至 1.0 mL,混匀后备用。同样操作步骤处理乙酸标准和空白培养液。

B.2.3.2 乳酸的处理

取双歧杆菌培养液 2.0 mL~3.0 mL 放入 10 mL 比色管中,100 °C 水浴 10 min,加入 0.2 mL 50% (体积分数)硫酸溶液,混匀,加入 1.0 mL 甲醇,于 58 °C 水浴 30 min 后加水 1.0 mL,加三氯甲烷 1.0 mL,振摇 3 min,3 000 r/min 离心 5 min,取三氯甲烷层分析。同样操作步骤处理乳酸标准和空白培养液。

B.2.3.3 气相色谱条件

色谱柱:长 2 m、内径 4 mm 的玻璃柱,填充涂有 20% 邻苯二甲酸二壬酯(DNP)+7% 吐温 60 的 chromosorbw HP(80 目~100 目);柱温:110 °C;汽化室:150 °C;检测器:150 °C;载气(氮气):50 mL/min;进样量:1.0 μL;外标法峰面积定量。

B.2.4 结果计算

按式(B.1)计算。

$$X = \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{空}}}{A_{\text{标}} \times c} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

X ——样品培养液中乙酸或乳酸的含量,单位为微摩尔每毫升($\mu\text{mol}/\text{mL}$);

$A_{\text{样}}$ ——样品培养液中乙酸或乳酸的峰面积;

$A_{\text{空}}$ ——空白培养液中乙酸或乳酸的峰面积;

$A_{\text{标}}$ ——乙酸标准或乳酸标准的峰面积;

c ——乙酸标准或乳酸标准的浓度,单位为微摩尔每毫升($\mu\text{mol}/\text{mL}$)。

B.2.5 允许差

相对偏差 $\leq 15\%$ 。

B.2.6 结果判定

如果乙酸($\mu\text{mol}/\text{mL}$)与乳酸($\mu\text{mol}/\text{mL}$)比值大于 1,可判定为是双歧杆菌的有机酸代谢产物。

B.2.7 气相色谱图

乳酸和乙酸标准色谱图分别见图 B.1 和图 B.2。



图 B.1 乳酸标准色谱图

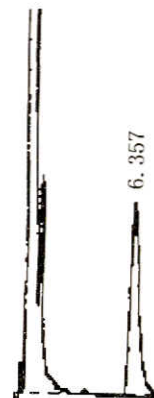


图 B.2 乙酸标准色谱图

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食 品 卫 生 微 生 物 学 检 验
双 歧 杆 菌 检 验

GB/T 4789.34—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 19 千字
2009年3月第一版 2009年3月第一次印刷

*

书号:155066·1-36027 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 4789.34—2008