



中华人民共和国国家标准

GB 4789.35—2023

食品安全国家标准

食品微生物学检验 乳酸菌检验

2023-09-06 发布

2024-03-06 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 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》。

本标准与 GB 4789.35—2016 相比,主要变化如下:

- 增加了实时荧光 PCR 方法为选做方法;
- 修改了乳酸菌的定义、样品制备、培养时间;
- 修改了嗜热链球菌和乳杆菌计数方法的描述;
- 修改了部分培养基成分、储备液浓度和制备方法。

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,不能液化明胶、不产生吲哚、革兰氏阳性、无运动、无芽孢、触酶阴性、硝酸还原酶阴性及细胞色素氧化酶阴性反应的细菌。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(*Streptococcus thermophilus*)。

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 厌氧培养装置:厌氧培养箱、厌氧罐、厌氧袋或能提供同等厌氧效果的装置。
- 3.3 冰箱:2℃~8℃。
- 3.4 均质器及无菌均质袋、均质杯或灭菌乳钵。
- 3.5 涡旋混匀仪。
- 3.6 电子天平:感量0.001g。
- 3.7 实时定量PCR仪。
- 3.8 恒温水浴锅或金属浴。
- 3.9 离心机:离心力 $>10\,000\times g$ 。
- 3.10 无菌试管:18mm×180mm、15mm×100mm。
- 3.11 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)。
- 3.12 微量移液器和灭菌吸头:2μL、10μL、100μL、200μL、1000μL。
- 3.13 无菌锥形瓶:500mL、250mL。
- 3.14 无菌平皿:直径90mm。
- 3.15 PCR管。

4 培养基和试剂

- 4.1 稀释液:见附录A中A.1。
- 4.2 MRS(Man Rogosa Sharpe)琼脂培养基:见附录A中A.2。
- 4.3 莫匹罗星锂盐(Li-Mupirocin)和半胱氨酸盐酸盐(Cysteine Hydrochloride)改良MRS琼脂培养

基:见附录 A 中 A.3。

4.4 MC(Modified Chalmers)琼脂培养基:见附录 A 中 A.4。

4.5 0.5%蔗糖发酵管:见附录 A 中 A.5。

4.6 0.5%纤维二糖发酵管:见附录 A 中 A.5。

4.7 0.5%麦芽糖发酵管:见附录 A 中 A.5。

4.8 0.5%甘露醇发酵管:见附录 A 中 A.5。

4.9 0.5%水杨苷发酵管:见附录 A 中 A.5。

4.10 0.5%山梨醇发酵管:见附录 A 中 A.5。

4.11 0.5%乳糖发酵管:见附录 A 中 A.5。

4.12 七叶苷发酵管:见附录 A 中 A.6。

4.13 革兰氏染色液:见附录 A 中 A.7。

4.14 生理盐水:见附录 A 中 A.8。

4.15 DNA 提取液:见附录 A 中 A.9。

4.16 10×PCR 缓冲液:见附录 A 中 A.10。

4.17 莫匹罗星锂盐($C_{26}H_{43}O_9 \cdot Li$):化学纯。

4.18 半胱氨酸盐酸盐($C_3H_8ClNO_2S$):纯度>99%。

4.19 dNTPs。

4.20 *Taq* DNA 聚合酶:5 U/ μ L。

4.21 七种乳酸菌引物探针。

4.22 灭菌去离子水。

5 检验程序

乳酸菌检验程序见图 1。

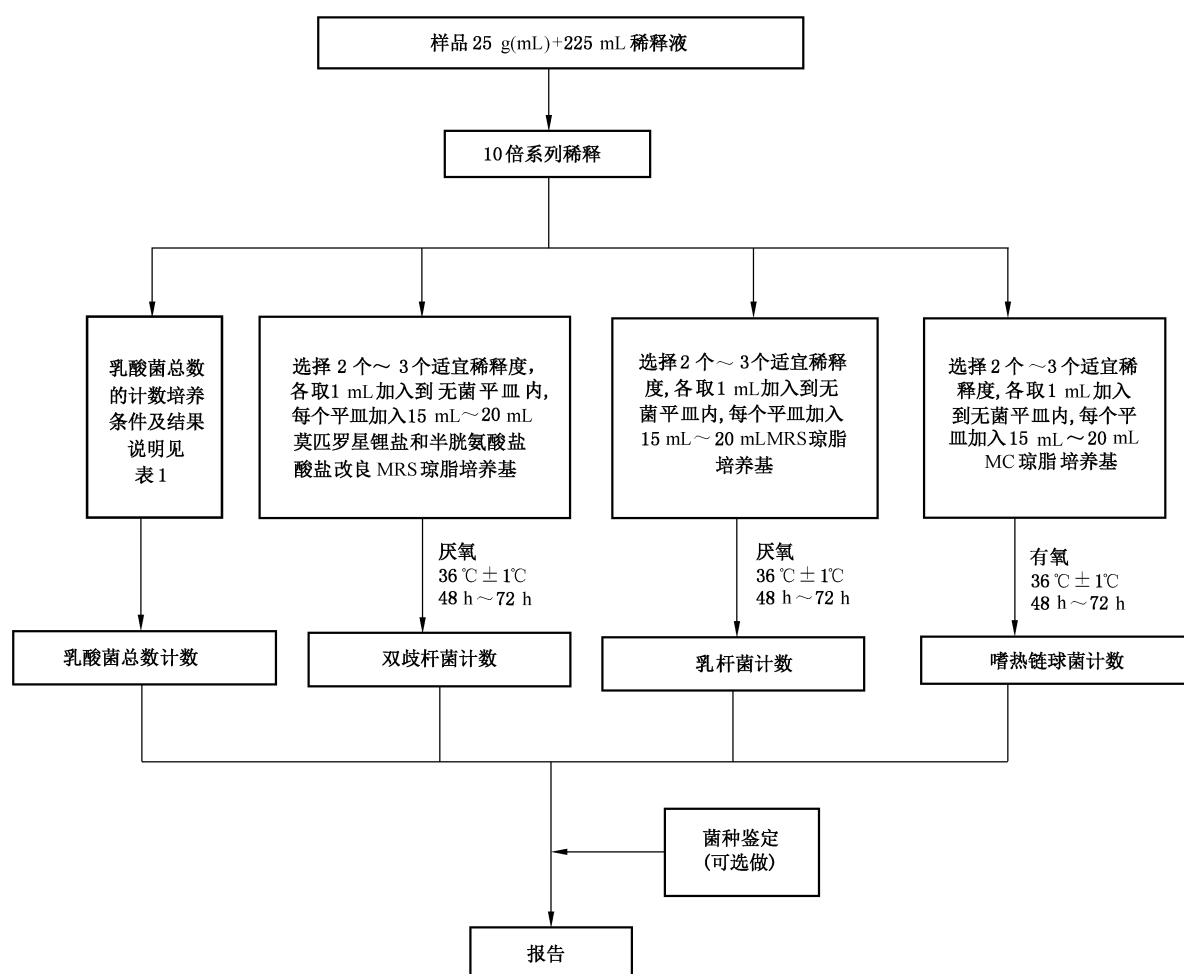


图 1 乳酸菌检验程序图

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 稀释液在试验前应在 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下充分预热 $15\text{ min} \sim 30\text{ min}$ 。

6.1.3 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 。

6.1.4 固体和半固体样品: 以无菌操作称取 25 g 样品, 置于装有 225 mL 稀释液的无菌均质杯内, 于 $8\,000 \times g \sim 10\,000 \times g$ 均质 $1\text{ min} \sim 2\text{ min}$, 制成 $1:10$ 样品匀液; 或置于 225 mL 稀释液的无菌均质袋中, 用拍击式均质器拍打 $1\text{ min} \sim 2\text{ min}$ 制成 $1:10$ 的样品匀液。

6.1.5 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 稀释液的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)或均质袋中, 充分振摇或拍击式均质器拍打 $1\text{ min} \sim 2\text{ min}$, 制成 $1:10$ 的样品匀液。

6.1.6 经特殊技术(如包埋技术)处理的含乳酸菌食品样品应在相应技术/工艺要求下进行有效前处理。

6.2 稀释及培养

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 稀释液的无菌试管中(注意吸管或微量移液器吸头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 经特殊技术(如包埋技术)处理的含乳酸菌食品应按照相应技术/工艺要求进行稀释。

6.3 乳酸菌计数

6.3.1 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类别	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 6.3.4 操作,厌氧培养。结果即为乳杆菌属总数
仅包括嗜热链球菌	按照 6.3.3 操作。结果即为嗜热链球菌数
同时包括双歧杆菌属和乳杆菌属	1) 按照 6.3.4 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 6.3.2 操作
同时包括双歧杆菌属和嗜热链球菌	1) 按照 6.3.2 和 6.3.3 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 6.3.2 操作
同时包括乳杆菌属和嗜热链球菌	1) 按照 6.3.3 和 6.3.4 操作,二者结果之和即为乳酸菌总数; 2) 6.3.3 结果为嗜热链球菌总数; 3) 6.3.4 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 6.3.3 和 6.3.4 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 6.3.2 操作

6.3.2 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 ℃~50 ℃的莫匹罗星锂盐和半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 琼脂培养基倾注入平皿 15 mL~20 mL,转动平皿使混合均匀。培养基凝固后倒置于 36 ℃±1 ℃厌氧培养,根据双歧杆菌生长特性,一般选择培养 48 h,若菌落无生长或生长较小可选择培养至 72 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。

6.3.3 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 ℃~50 ℃的 MC 琼脂培养基及时倾注入平皿 15 mL~20 mL,转动平皿使混合均匀。培养基凝固后倒置于 36 ℃±

1℃有氧培养,根据嗜热链球菌生长特性,一般选择培养 48 h,若菌落无生长或生长较小可选择培养至 72 h。嗜热链球菌在 MC 琼脂培养基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 $2\text{ mm}\pm 1\text{ mm}$,菌落背面为粉红色。

6.3.4 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 $48\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 MRS 琼脂培养基倾注入平皿 15 mL~20 mL,转动平皿使混合均匀。培养基凝固后倒置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养,根据乳杆菌生长特性,一般选择培养 48 h,若菌落无生长或生长较小可选择培养至 72 h。从样品稀释到平板倾注要求在 15 min 内完成。

6.4 菌落计数

见 GB 4789.2 菌落计数部分。

6.5 结果的表述

见 GB 4789.2 计算方法部分。

6.6 菌落数的报告

见 GB 4789.2 菌落总数的报告部分。

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 第一法 生化鉴定

8.1.1 纯培养

挑取 3 个或以上单菌落,嗜热链球菌接种于 MC 琼脂平板,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 有氧培养 48 h,乳杆菌属接种于 MRS 琼脂平板,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 48 h。

8.1.2 双歧杆菌的鉴定

按 GB 4789.34 的规定操作。

8.1.3 涂片镜检

嗜热链球菌菌体镜下呈球形或球杆状,直径为 $0.5\text{ }\mu\text{m}\sim 2.0\text{ }\mu\text{m}$,成对或成链排列,无芽孢,革兰氏染色阳性。乳杆菌属镜下菌体形态多样,呈长杆状、弯曲杆状或短杆状,无芽孢,革兰氏染色阳性。

8.1.4 乳酸菌菌种主要生化反应

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主要生化反应

菌种	七叶苷	纤维二糖	麦芽糖	甘露醇	水杨苷	山梨醇	蔗糖	棉籽糖
干酪乳杆菌(<i>L.casei</i>) 鼠李糖乳杆菌 (<i>L.rhamnosus</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	—	+	—	—	—	+	+
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。							

8.2 第二法 实时荧光 PCR 法鉴定

8.2.1 纯培养

同 8.1.1。

8.2.2 DNA 模板制备

使用接种环刮取 MC 琼脂平板或 MRS 琼脂平板上的菌落 2 个~10 个,悬浮于 200 μL 灭菌生理盐水中,充分混匀,10 000 $\times g$ ~12 000 $\times g$ 离心 3 min,弃去上清。加入 50 μL DNA 提取液涡旋混匀,置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴或者金属浴中 10 min 后迅速冷却,10 000 $\times g$ ~12 000 $\times g$ 离心 3 min。吸取上清液至新的 PCR 反应管内,作为 DNA 模板使用。提取后的 DNA 模板应置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 供当天使用,否则应于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存,并于 1 周内使用。

注：根据实验室实际情况,也可用商品化试剂盒制备 DNA 模板。

8.2.3 PCR 反应体系

总反应体系体积为 25 μL :10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL 、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、探针(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL 、dNTPs (2.5 $\mu\text{mol/L}$)3 μL 、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)0.5 μL 、模板 DNA 1 μL 、灭菌去离子水补足至 25 μL 。每个反应均应设置至少 2 个平行。

注：反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。亦可选用含有 PCR 缓冲液、 MgCl_2 、dNTP 和 *Taq* 酶等成分基于 Taqman 探针的实时荧光 PCR 预混液。

8.2.4 PCR 反应条件

50 ℃ 5 min, 95 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火延伸 40 s (同时收集 FAM 荧光), 进行 40 个循环。

注: PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号实时荧光 PCR 反应体系进行适当调整。

鉴定用引物和探针序列见表 4。

表 4 常见乳酸菌实时荧光 PCR 检测引物和探针序列

菌种	引物序列	探针序列
干酪乳杆菌(<i>L.casei</i>)	5'-GCCGGGATCTTCAACTCAAC-3'	5'-FAM-TCGCCCCAATGCAGCCT-GCGC-TAMRA-3'
	5'-GGACGGCGCAGAAATCTATC-3'	
德氏乳杆菌保加利亚亚种(<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	5'-ACTTTAGCCCATACCTGCGT-3'	5'-FAM-CCGGTTGCCCGTTTC-CTGCGG-TAMRA-3'
	5'-GTAAATTCCAAGCCGCCCTT-3'	
嗜酸乳杆菌(<i>L.acidophilus</i>)	5'-GAGCTGAACCAACAGATTAC-3'	5'-FAM-CCCATCCGC-CGCTAGCGTT-TAMRA-3'
	5'-GCAGGTTCCCCACGTGTTAC-3'	
罗伊氏乳杆菌(<i>L.reuteri</i>)	5'-CTTTCGCAGCCTGATAGTGG-3'	5'-FAM-CGGTTGCAGCATTAGT-TCCTCGTGC-TAMRA-3'
	5'-TCCGAAGAGCCTGAGACATC-3'	
鼠李糖乳杆菌(<i>L.rhamnosus</i>)	5'-GGTTGATTCACTGGCAGCTC-3'	5'-FAM-TCAATTTCTGCGCGCG-GTACCA-TAMRA-3'
	5'-GTGTGCATCACCCATGTCC-3'	
植物乳杆菌(<i>L.plantarum</i>)	5'-AGCTTGAAAGATGGCTTCGG-3'	5'-FAM-ACGCCGCGGGACCATC-CAAA-TAMRA-3'
	5'-GGTCGGCTACGTATCATTGC-3'	
嗜热链球菌(<i>S.thermophilus</i>)	5'-GCCTGATTCTGGTGAGCAAG-3'	5'-FAM-TCCACTGCACCAGAGT-CAATCAGCT-TAMRA-3'
	5'-CCGCAACTGAGTCAACAACA-3'	

8.2.5 对照设置

检测过程(包括 DNA 提取)中,每个反应均应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。其中阳性对照模板为扩增片段的阳性克隆分子 DNA 或阳性菌株 DNA,阴性对照模板为非乳酸菌菌株 DNA,空白对照模板为无菌水。

8.2.6 结果判读

8.2.6.1 对照的结果判读

阳性对照出现典型扩增曲线, $C_t \leq 30$; 阴性对照无典型扩增曲线或 $C_t \geq 40$; 空白对照无典型扩增曲线或 $C_t \geq 40$ 。否则,结果视为无效。

8.2.6.2 样品的结果判读

当样品检测 $C_t \geq 40$ 时,判定样品结果为某种乳酸菌阴性;当检测 $C_t \leq 35$,可判定该样品结果为某种乳酸菌阳性;当检测 $35 < C_t < 40$ 时,重复试验,若重复试验结果检测 $C_t \geq 40$,则判定为某种乳酸菌阴性,否则,判定为某种乳酸菌阳性。

附 录 A

培养基及试剂

A.1 稀释液

A.1.1 成分

NaCl	8.5 g
胰蛋白胨	15 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 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.2 MRS 琼脂培养基

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	10.0 g
酵母浸粉	5.0 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
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 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 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.3 莫匹罗星锂盐和半胱氨酸盐酸盐改良 MRS 琼脂培养基

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 5 mL 蒸馏水中,用 $0.22 \mu m$ 微孔滤膜过滤除菌,临用现配。

A.3.2 半胱氨酸盐酸盐储备液制备:称取 500 mg 半胱氨酸盐酸盐加入到 10 mL 蒸馏水中,用 $0.22 \mu m$ 微孔滤膜过滤除菌,临用现配。

A.3.3 制法

将 A.2.1 成分加入到 985 mL 蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至 6.2 ± 0.2 ,分装后 121 ℃ 高压灭菌 15 min。临用时加热熔化琼脂,在水浴中冷至 $48 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50 \text{ }^{\circ}\text{C}$,用无菌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 $50 \mu g/mL$,半胱氨酸盐酸盐的浓度为 $500 \mu g/mL$ 。

A.4 MC 琼脂培养基**A.4.1 成分**

大豆蛋白胨	5.0 g
牛肉浸粉	5.0 g
酵母浸粉	5.0 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。

A.5 乳杆菌糖发酵管**A.5.1 成分**

牛肉浸粉	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸粉	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。

A.6 七叶苷发酵管**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, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 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 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。

A.8 生理盐水

A.8.1 成分

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

A.8.2 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。

A.9 DNA 提取液**A.9.1 成分**

chelex 100 粉末	0.1 g
---------------	-------

A.9.2 制法

将上述成分加入到 100 mL 蒸馏水中混匀。

A.10 10×PCR 缓冲液**A.10.1 成分**

KCl	1.49 g
MgCl ₂	0.14 g
Tris-HCl(pH=8.8)	20 mL

A.10.2 制法

将上述成分加入到 80 mL 蒸馏水中混匀,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。
