

中华人民共和国国家标准

GB 4789.34—2012

食品安全国家标准

食品微生物学检验 双歧杆菌的鉴定

2012-05-17 发布

2012-07-17 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.34-2008 《食品卫生微生物学检验 双歧杆菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.34-2008 相比，主要变化如下：

- 修改了标准的中文名称；
- 修改了培养基和试剂；
- 删除了果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶（F6PPK）测定和双歧杆菌的计数方法。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 双歧杆菌的鉴定

1 范围

本标准规定了食品中双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 的鉴定方法。
本标准适用于食品中双歧杆菌的鉴定。

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:

- a) 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- b) 气相色谱仪配 FID 检测器;
- c) 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- d) 天平: 感量 0.1 g ;
- e) 无菌试管: $18\text{ mm} \times 180\text{ mm}$ 、 $15\text{ mm} \times 100\text{ mm}$;
- f) 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 ($200\text{ }\mu\text{L} \sim 1000\text{ }\mu\text{L}$) 及配套吸头;
- g) 无菌锥形瓶: 500 mL 、 250 mL 。

3 培养基和试剂

3.1 双歧杆菌培养基: 见附录 A 中的 A.1。

3.2 PYG 液体培养基: 见附录 A 中的 A.2。

3.3 甲醇: 分析纯。

3.4 三氯甲烷: 分析纯。

3.5 硫酸: 分析纯 (体积比)。

3.6 冰乙酸: 分析纯 (体积比)。

3.7 乳酸: 分析纯。

3.8 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, 标定方法见附录 B, 此溶液浓度约为 1 mol/L 。

3.9 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 。

3.10 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, 标定方法见附录 B, 此溶液浓度约为 1 mol/L 。

3.11 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 鉴定程序

双歧杆菌鉴定程序见图 1。

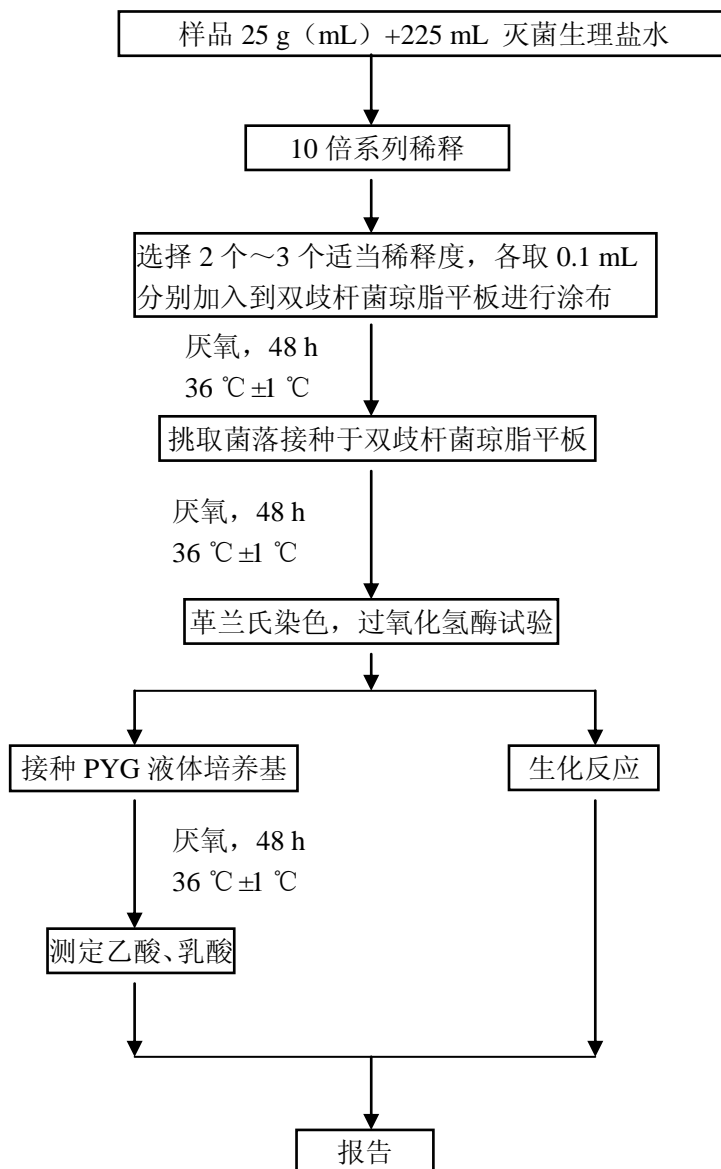


图1 双歧杆菌鉴定程序

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 (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 稀释及涂布培养步骤

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 5.2.1 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 根据待鉴定菌种的活菌数，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，用 L 棒在双歧杆菌琼脂平板进行表面涂布，每个稀释度作两个平皿。置 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱内培养 $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ ，培养后选取单个菌落进行纯培养。

5.3 纯培养

挑取 3 个或以上的菌落接种于双歧杆菌琼脂平板，厌氧， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 生化鉴定

过氧化氢酶试验为阴性。选取纯培养平板上的三个单个菌落，分别进行生化反应检测，不同双歧杆菌菌种主要生化反应见附录 B。

5.5 有机酸代谢产物测定

气相色谱法测定双歧杆菌的有机酸代谢产物，见附录 C。

6 报告

根据镜检及生化鉴定的结果（5.4）、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（5.5），报告双歧杆菌属的种名。

附录 A

培养基

A.1 双歧杆菌琼脂培养基

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	400.0 mL
吐温 80	1.0 mL
肝粉	0.3 g
琼脂粉	15.0 g~20.0 g
加蒸馏水至	1 000.0 mL

A.1.2 制法

A.1.2.1 半胱氨酸盐溶液

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

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 培养基

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 pH 6.8±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 5mg/mL	2.5 mL
加蒸馏水至	500.0 mL

A.2.2 制法

A.2.2.1 盐溶液

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 1000 mL。

A.2.2.2 氯化血红素溶液 (5mg/mL)

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 1000 mL，121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A. 2. 2. 3 维生素 K₁ 溶液

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 培养基

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。

附录 B

双歧杆菌菌种主要生化反应

双歧杆菌菌种主要生化反应见表 B.1。

表 B.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-木糖甙	—	—	—	—	—	—
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-甘露糖甙	—	—	—	—	—	—
21	α-甲基-D-葡萄糖甙	—	—	+	—	—	—
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	—	+	+	+	+	+

表 B.1 (续) 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>)
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。

附录 C

气相色谱法测定双歧杆菌的有机酸代谢产物

C.1 双歧杆菌培养液制备

挑取双歧杆菌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， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养48 h。

C.2 标准液的配制

C.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。

C.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。

C.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用1 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。

C.2.4 乳酸使用液

将乳酸标准溶液用水稀释至 20.0 mmol/L。

C.3 方法

C.3.1 乙酸的处理

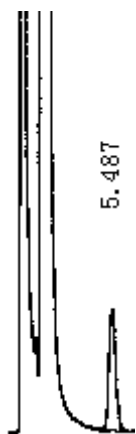
取双歧杆菌培养液 2.0 mL~3.0 mL 放入 10 mL 离心管中，加入 0.2 mL 50%（体积比）硫酸溶液，混匀，加入 2.0 mL 丙酮，混匀后加过量氯化钠，剧烈振摇 1 min，再加入 2.0 mL 乙醚，振摇 1 min 后，于 3000 r/min 离心 5 min，将上清液转入另一试管中，下层溶液用 2.0 mL 丙酮和 2.0 mL 乙醚重复提取 2 次，合并有机相，于 40 °C 水浴中用氮气吹至少量溶液存在，用丙酮定容至 1.0 mL，混匀后备用。同样操作步骤处理乙酸标准和空白培养液。

C.3.2 乳酸的处理

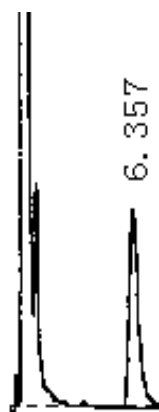
取双歧杆菌培养液 2.0 mL~3.0 mL 放入 10 mL 比色管中，100 °C 水浴 10 min，加入 0.2 mL 50%（体积比）硫酸溶液，混匀，加入 1.0 mL 甲醇，于 58 °C 水浴 30 min 后加水 1.0 mL，加三氯甲烷 1.0 mL，振摇 3 min，3000 r/min 离心 5 min，取三氯甲烷层分析。同样操作步骤处理乳酸标准和空白培养液。

C.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% DNP + 7% 吐温 60 (Tween60) 的 chromosorbw HP (80~100 目)；柱温：110 °C；汽化室：150 °C；检测器：150 °C；载气：(N₂) 50 ml/min；进样量 1.0 μl；外标法峰面积定量。乳酸标准溶液的气相色谱见图 C.1，乙酸标准溶液的气相色谱见图 C.2。



图C.1 乳酸标准溶液的气相色谱



图C.2 乙酸标准溶液的气相色谱

C.4 结果计算

样品培养液中乙酸或乳酸的含量按式 (C.1) 计算:

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

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 ($\mu\text{mol/mL}$);

$A_{\text{样}}$ ——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 ($\mu\text{mol/mL}$)。

C.5 允许差

相对相差 $\leq 15\%$ 。

C.6 结果判定

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