

百事可乐微生物检查方法的优化研究

苏健, 何薛纯, 陈隽, 贾忆雪, 马迹东, 施炎炎*

(南通市食品药品监督检验中心, 南通 226001)

摘要:目的 百事可乐中添加苯甲酸钠和山梨酸钾作为抑菌剂以抑制微生物生长, 需排除这些抑菌剂对微生物检验结果的干扰, 使其微生物检查方法准确可靠。**方法** 本文通过选择在样品中添加典型菌株, 采用常规培养基计数法和薄膜过滤法, 对百事可乐中菌落总数、大肠菌群、霉菌和酵母菌总数三个检测项目的两种方法的菌株检测回收率进行分析, 从而选择高回收率的方法作为样品的最佳微生物检查方法。**结果** 薄膜过滤法的菌株平均回收率为92%, 常规培养基计数法的平均回收率为23%, 实验结果表明, 两种方法结果存在显著差异, 薄膜过滤法可以有效排除百事可乐中抑菌剂的干扰。**结论** 百事可乐微生物检测方法采用薄膜过滤法, 显著提高了结果的准确性。

关键词: 培养基计数法; 薄膜过滤法; 回收率

0 引言

饮料中含有丰富的营养物质, 为微生物生长提供了适宜的条件, 由于百事可乐生产过程中并非无菌操作, 在生产和储存过程中可能受到微生物的污染, 会导致饮料中滋生细菌, 这些微生物会分解其中的营养成分, 导致饮料变质, 产生异味和有害物质, 对人体健康造成威胁。按中华人民共和国国家标准 GB 7101—2022《食品安全国家标准 饮料》^[1]规定, 百事可乐的微生物检查控制项目为菌落总数、大肠菌群、霉菌和酵母菌总数测定, 这些项目的准确检测是评估饮料卫生状况的关键手段。百事可乐中常用的抑菌剂为苯甲酸钠和山梨酸钾等, 这些抑菌剂能够干扰微生物的细胞膜的正常功能、破坏微生物的细胞结构, 从而达到防腐的目的。

现有方法不能排除抑菌剂对微生物检查的干扰, 本研究选用大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉为试验菌种, 大肠埃希菌作为革兰氏阴性菌株、枯草杆菌为芽孢菌株、金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌株, 白色念珠菌和黑曲霉代表了酵母菌的致病性真菌的典型种类。菌落总数的测定是在平板计数琼脂培养基上, 36℃左右有氧条件下培养, 可以生长的微生物菌落的总数, 不区别细菌种类, 所以可以选这些标准菌株作为方法适用性的考核对象。按中华人民共和国国家标准 GB 4789.2—2022《食品安全国家标准 食品微生物检验 菌落总

数测定》^[2]、中华人民共和国国家食品安全国家标准 GB 4789.3—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》^[3]和中华人民共和国国家标准 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》^[4]测定含抑菌剂的百事可乐的微生物检测回收率, 比较常规培养基计数法和薄膜过滤法^[5]两种检验方法的回收率结果差异^[6-10], 来确定薄膜过滤法的方法准确性。

1 材料与方法

1.1 样品信息、器材及菌种

百事可乐: 600 mL/瓶, 生产日期 2024-07-26, 上海百事可乐饮料有限公司生产。

实验所用的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉五种菌株, 均来自中国食品药品检定研究院; 菌落计数琼脂培养基(PCA), 广东环凯微生物科技有限公司, 批号 1107311; 胰酪大豆胨液体培养基(TSB), 美国 BD 公司, 批号 3114509; 沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA), 美国 BD 公司, 批号 3096327; 0.9% 无菌氯化钠溶液, 225 mL/袋, 广东环凯微生物科技有限公司, 批号 240809Y05; 结晶紫中性红胆盐琼脂培养基, 500 g/瓶, 广东环凯微生物科技有限公司, 批号 1107711; 微孔滤膜, 47 mm 0.45 μm, 杭州标迈生物技术有限公司; 一次性无菌滤杯, 浙江泰林生物技术股份有限公司。

第一作者: 苏健, 副主任药师, 研究方向食品药品质量检定及质量标准。

* 通信作者: 施炎炎, 硕士, 研究方向为化学分析。E-mail: shiyanyanhuagong@163.com

1.2 仪器

GNP-9270BS 隔水式恒温培养箱, 江苏海门市恒昌仪器厂; MJ-250- II 霉菌培养箱(江苏省海门市恒昌仪器厂); SQ810C 立式压力蒸汽灭菌锅, 重庆市中容石化机械制造有限公司; AC2-6S1 生物安全柜, 益世科生物空气技术有限公司; HTY-305S 微生物检验仪, 浙江泰林生物技术股份有限公司; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; LC-11L 拍打式无菌均质器, 上海净信实业发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基制备

称取菌落计数琼脂培养基 94.5 g, 加去离子水 4000 mL 缓慢加热并不断搅拌使分散均匀, 分装于具塞瓶中, 121 °C 灭菌 15 min; 取结晶紫中性红胆盐琼脂培养基 207.5 g, 加去离子水 5000 mL 加热煮沸备用; 取胰酪大豆胨液体培养基(TSB) 30 g, 加去离子水 1000 mL, 加热使溶解, 分装于具塞瓶中, 121 °C 灭菌 15 min; 取沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA) 65 g, 加去离子水 1000 mL 缓慢加热并不断搅拌使分散均匀, 分装于具塞瓶中, 121 °C 灭菌 15 min。

1.3.2 菌液制备

金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌菌液制备, 取新鲜培养物接种至胰酪大豆胨液体培养基中, 置 34 °C 培养 24 h。用灭菌生理盐水分别稀释成每 1 mL 含菌量不大于 100 CFU 的菌悬液。

取白色念珠菌的 25 °C 培养 72 h 的培养物用灭菌生理盐水分别稀释成每 1 mL 含菌量不大于 100 CFU 的菌悬液。

取黑曲霉的培养物加入含适量吐温 80 的灭菌生理盐水分别稀释成每 1 mL 含菌量不大于 100 CFU 的孢子悬液。

1.3.3 供试液制备

取样品 25 mL 置于盛有 225 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液的无菌均质袋中, 置拍击式无菌均质器中拍击 1~2 min, 使成 1 : 10 供试溶液。

1.3.4 菌落总数、霉菌和酵母菌计数试验菌回收率试验

试验组操作: 吸取 1 : 10 稀释的供试液 9.9 mL, 每种试验菌平行制备 2 份, 每份中加入 0.1 mL 的试验菌悬液, 混匀, 使每 1 mL 供试液或每张滤膜的含菌量不大于 100 CFU, 分为两组: ①常规法: 取混合液 1 mL 加入相应的培养基, 混匀后按标准温度培养; ②薄膜过滤法: 取混合液 1 mL 加入 50 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 用 100 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液冲洗, 滤干后将滤膜(菌面朝上)贴于相应培养基, 按标准温度进行培养。

菌液对照组操作: 取 0.9% 无菌氯化钠溶液 9.9 mL, 每种试验菌平行制备 2 份, 每份中加入 0.1 mL 的试验菌悬液, 混匀, 使每 1 mL 供试液或每张滤膜的含菌量不大于 100 CFU, 分为两组, 两种方法同试验组。

供试品对照组: 吸取 1 : 10 的供试液 9.9 mL, 加入 0.9% 无菌氯化钠溶液 0.1 mL, 平行制备 2 份, 分为两组, 两种方法同试验组。

平行进行 3 次独立试验, 按中华人民共和国国家标准食品安全国家标准 GB 4789.2—2022《食品微生物检验 菌落总数测定》和中华人民共和国国家标准 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》操作, 进行计数, 并计算各试验菌株的回收比值。

各试验菌回收比值 = (试验组的 CFU 平均数 - 供试品对照组的 CFU 平均数) / 菌液组的 CFU 平均数。

1.3.5 大肠菌群测定试验菌回收率试验

试验组操作: 吸取 1 : 10 稀释的供试液 9.9 mL, 用大肠埃希菌试验菌平行制备 2 份, 每份中加入 0.1 mL 的试验菌悬液, 混匀, 使每 1 mL 供试液或每张滤膜的含菌量不大于 100 CFU, 分为两组: ①常规法: 取混合液 1 mL 加入 46 °C 结晶紫中性红胆盐琼脂培养基, 冷却凝固后, 用 4 mL 同样培养基覆盖, 按规定温度培养; ②薄膜过滤法: 取混合液 1 mL 加入 50 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 用 100 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液冲洗, 滤干后将滤膜(菌面朝上)贴于结晶紫中性红胆盐琼脂培养基上, 用 4 mL 同样培养基覆盖, 按规定温度进行培养。

菌液对照组操作: 取 0.9% 无菌氯化钠溶液 9.9 mL, 用大肠埃希菌试验菌平行制备 2 份, 每份中加入 0.1 mL 的试验菌悬液, 混匀, 使每 1 mL 供试液或每张滤膜的含菌量不大于 100 CFU, 分为两组, 两种方法同试验组。

供试品对照组: 吸取 1 : 10 稀释的供试液 9.9 mL, 加入 0.9% 无菌氯化钠溶液 0.1 mL, 平行制备 2 份, 分为两组, 两种方法同试验组。

平行进行 3 次独立试验, 按中华人民共和国国家标准食品安全国家标准 GB 4789.3—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》操作, 进行计数, 并计算试验菌株的回收比值。计算公式同 1.4.4。

2 结果与分析

2.1 菌落总数、霉菌和酵母菌计数

常规培养基计数法测定结果见表 1。结果表明, 5 种试验菌的回收率均小于 50%, 该饮料的抑菌剂对这 5 种典型菌株存在不同程度的干扰, 尤其表现为对大肠埃希菌的生长抑制, 影响检验结果。

表 1 常规方法的试验菌回收率结果

试验菌	试验组 / (CFU/mL)	菌液对照组 / (CFU/mL)	供试品对照组 / (CFU/mL)	回收率 / %
金黄色葡萄球菌	15	87	0	17
大肠埃希菌	13	90	0	14
枯草芽孢杆菌	16	89	0	18
白色念珠菌	29	91	0	32
黑曲霉	28	79	0	35

由于常规方法干扰菌落总数、霉菌和酵母菌计数测定结果, 需使用薄膜过滤法进行实验比较, 结果见表 2。

表 2 薄膜过滤法的试验菌回收率结果

试验菌	试验组 / (CFU/mL)	菌液对照组 / (CFU/mL)	供试品对照组 / (CFU/mL)	回收率 / %
金黄色葡萄球菌	87	92	0	95
大肠埃希菌	81	93	0	87
枯草芽孢杆菌	86	89	0	97
白色念珠菌	80	87	0	92
黑曲霉	75	82	0	91

采用薄膜过滤法检测时, 五种试验菌的回收率均超过 50%(金黄色葡萄球菌 95%、大肠埃希菌 87%、枯草芽孢杆菌 97%、白色念珠菌 92%、黑曲霉 91%), 显著高于常规方法。这表明薄膜过滤法能有效消除百事可乐中抑菌剂对微生物生长的抑制作用, 大幅度提高检测结果的可靠性。

2.2 大肠菌群测定

常规方法和薄膜过滤法测定, 结果分别见表 3 和表 4。

表 3 常规方法的大肠埃希菌回收率结果

项目	大肠埃希菌
试验组 / (CFU/mL)	12
菌液对照组 / (CFU/mL)	79
供试品对照组 / (CFU/mL)	0
回收率 / %	15

结果表明, 该试验菌的回收率均小于 50%, 该饮料的抑菌剂干扰大肠菌群实验检验结果。

表 4 薄膜过滤法的大肠埃希菌回收率结果

项目	大肠埃希菌
试验组 / (CFU/mL)	79
菌液对照组 / (CFU/mL)	84
供试品对照组 / (CFU/mL)	0
回收率 / %	94

结果表明, 使用薄膜过滤法使该试验菌的回收率远远大于常规法, 提升了结果的准确性。

3 讨论与结论

本文使用常规微生物计数法和薄膜过滤法, 对五种典

型试验菌株进行了微生物回收率试验, 通过比较百事可乐中添加五种典型菌株的回收率试验数据, 常规方法的五种菌的平均回收率为 23%, 薄膜过滤法的五种菌的平均回收率为 92%, 大肠菌群项目中大肠埃希菌的回收率结果中, 常规方法的回收率为 15%, 薄膜过滤法为 94%, 显而易见, 采用薄膜过滤法检查百事可乐中的微生物, 其结果会更为准确。在饮料生产过程中, 微生物检验是确保产品质量和安全的关键步骤。使用正确的微生物检查方法检测饮料中菌落总数、霉菌和酵母菌总数、大肠菌群等指标可以反映其中的卫生状况。饮料中常用的抑菌剂包括苯甲酸钠和山梨酸钾, 它们具有广谱抗菌性能, 合法合规添加抑菌剂是安全的, 不会对身体造成不利影响。这些抑菌剂的毒性较低, 因此在正常剂量下使用不会对人体健康构成威胁。抑菌剂虽然可以延长食品保质期, 但会对微生物检验形成干扰, 按常规方法检验不能反映真实微生物的数量, 建议食品微生物检验领域, 在检查含抑菌剂的饮料中的微生物时, 借鉴薄膜过滤法进行检查, 以呈现其中的真实结果及在生产过程中的卫生状况。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准饮料: GB 7101—2022 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [2] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准食品微生物学检验菌落总数测定: GB 4789.2—2022 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [3] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品微生物学检验大肠菌群计数: GB 4789.3—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [4] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数: GB 4789.15—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2020年版四部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 160-165.
- [6] 刘长富, 蔡伟江, 彭婷婷. B族维生素泡腾片中微生物限度方法的研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(6): 1936-1940.
- [7] 牛振东, 刘文杰, 江志杰, 等. 盐酸厄洛替尼片微生物限度检查方法研究 [J]. 生命科学仪器, 2019, 17(4): 86-90.
- [8] 冯旭, 汪家春, 赵龙, 等. 冬虫夏草口服液微生物限度检查方法学验证 [J]. 海军医学杂志, 2014, 35(6): 430-432.
- [9] 王周明. 试析食品微生物检验关键程序及操作要点 [J]. 食品安全导刊, 2023, (36): 36-39.
- [10] 伏莉. 食品微生物检验的质量控制 [J]. 现代食品, 2017, 23(1): 11-12.