

电阻抗法检测低酸性罐头食品商业无菌的方法研究*

Study on Determination of Commercial Sterilization of Low Acid Canned Food by Impedence Method

杜寒春,莫建光,卢安根,徐 慧

DU Han-chun, MO Jian-guang, LU An-gen, XU-Hui

(广西分析测试研究中心,广西南宁 530022)

(Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:应用电阻抗法检测低酸性罐头食品商业无菌中的大肠杆菌、枯草芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌、粪链球菌、生孢梭菌、沙门氏菌、蜡状芽孢杆菌等7种主要原因菌,建立一种低酸性罐头食品商业无菌的快速检测方法。电阻抗法全部检测过程可在3d内完成,检测结果快速、灵敏、准确可靠,适用于低酸性罐头食品商业无菌的快速检测。

关键词:电阻抗法 罐头 食品 商业无菌

中图分类号:TS297 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2010)03-0329-04

Abstract: Impedence method was applied in detection of major causative bacteria, such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium sporogene*, *Salmonella* and *Bacillus cereus*. A method to rapidly detect of commercial sterilization of low acid canned food was established. The results showed that it only took three days to accomplish the whole detection process. The detection results are quick, sensitive, accurate and reliable. The impedence method is applicable to rapidly detect commercial sterilization of low acid canned food.

Key words: impedence method, canned, food, commercial sterilization

罐头依据 pH 值的不同可分为低酸性罐头和酸性罐头。其中低酸性罐头食品除酒精饮料外,凡杀菌后平衡 pH 值大于 4.6、水活性值大于 0.85 的罐头食品,原来是低酸性的水果、蔬菜或蔬菜制品,为加热杀菌的需要而加酸降低 pH 值的,则属于酸化的低酸性罐头食品^[1]。

目前,国内外对罐头食品的检验主要采用常规法。我国的 GB/T 4789.26-2003《罐头食品商业无菌的检验》^[1]标准,还有联合国粮农组织(FAO)^[2]的《罐头食品商业无菌常规检验法》、美国 FDA^[3]和 AOAC^[4]的方法,对罐头食品商业无菌的检验都采用了统一的方法,即通过将样品保温观察至少 5~10d 后,再做内容物感官检查、测定 pH 值和显微镜

检查,以检查罐头中是否存在因加热杀菌不恰当或罐头密封不良而存有公共卫生意义的致病菌以及在通常温度下能在其中繁殖的非致病性微生物。

电阻抗法是通过测量微生物代谢引起的培养基电导率变化来测定样品微生物含量的一种快速检测方法,在国内外的食品微生物快速检测中已得到了广泛的应用,但是对超高温瞬时灭菌(UHT)奶、果汁等 UHT 产品商业无菌的检测,只有奥地利 SY-LAB 公司生产的微生物自动快速检测系统 BacTrac4300 建立了相关的检测方法^[5,6]。应用电阻抗法对罐头食品商业无菌进行快速检测在国内外均未见有报道。本实验结合低酸性罐头食品商业无菌检验中的主要原因菌的分析,以及实验室的菌株收集情况,选择了大肠杆菌等具有代表性的菌株进行研究,探索电阻抗法在低酸性罐头食品商业无菌检测中的应用,以期建立一种低酸性罐头食品商业无菌的快速检测方法。

收稿日期:2010-06-20

作者简介:杜寒春(1980-),女,硕士,工程师,主要从事微生物学分析检测研究。

* 自治区直属公益性科研院所基本科研业务费专项项目(2008ACZ08)资助。

1 材料与方 法

1.1 仪器和设备

微生物自动快速检测系统 BacTrac4300(奥地利 SY-LAB 公司生产)、HH·B11 型电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂生产)、BX51 型生物显微镜(OLYMPUS 公司生产)、SG2 型 pH 值计(梅特勒-托利多仪器有限公司生产)、pH 值试纸(EMD Chemicals Inc. 生产)、灭菌开罐刀。

1.2 材料与试剂

培养基: Bimedia002A(奥地利 SY-LAB 公司生产); 营养琼脂、液体硫乙醇酸盐培养基(北京陆桥公司生产); 营养肉汤、硫乙醇酸盐固体培养基、溴甲酚紫葡萄糖肉汤、庖肉培养基(自配)。

实验菌株: 大肠杆菌 ATCC8739、枯草芽胞杆菌 ATCC6633、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、粪链球菌 ATCC29212、生孢梭菌 ATCC11437 由广东省微生物菌种保藏中心提供; 沙门氏菌 CICC21482、蜡状芽胞杆菌 CICC10041 由中国工业微生物菌种保藏中心提供。

罐头食品: 各种规格包装的甜玉米罐头、热狗肠、豆豉鲑鱼罐头等共 30 份。

1.3 电阻抗法检测实验

1.3.1 临界值确定

(1) 制成菌悬液取生孢梭菌接种液体硫乙醇酸盐培养基, 36℃ 厌氧培养 24h。其他实验菌株接种营养肉汤, 36℃ 培养 24h。将培养物用生理盐水进行倍比稀释制成菌悬液备用。

(2) 取各实验菌株菌悬液 1 ml 分别接种至加有 9 ml Bimedia002A 培养液的测量瓶中进行预实验检测。各参数设置如下, 培养基阻抗值(M 值): 5%, 电极阻抗值(E 值): 0%, 培养温度: 36℃, 测量持续时间: 72h。观察 M 值和 E 值的变化曲线。

(3) 重现性实验。根据预实验结果预设临界值为 $M=5\%$ 或 $E=10\%$, 选取某菌株为代表菌株进行检测, 作 8 个平行。同时, 为了避免样液中营养物质分解出离子而影响测量结果, 用已灭菌的同稀释度的菌液作基线。

1.3.2 实验菌株标准曲线制作

按以下步骤进行: 菌悬液的稀释→同时分别取 1 ml 稀释液接种至测量瓶和平皿→将测量瓶放入 Bactrac 培养箱中检测(生孢梭菌的测量瓶盖旋紧, 其他实验菌株的测量瓶盖旋松 1/4 至 1/2 圈)→在平皿中倒入固体培养基混匀, 放入培养箱培养, 进行

平板菌落计数。以国标法菌落数(CFU)的对数为纵坐标, 对应的检测时间(IDT)值为横坐标, 将数据输入系统自带的数据处理软件中即可得到标准曲线和回归方程。

1.4 样品检测

1.4.1 开罐

将样罐用温水和洗涤剂洗刷干净, 用自来水冲洗后擦干。放入无菌室, 以紫外光杀菌灯照射 30min。用 75% 酒精棉球擦拭样罐外包装(铁盒罐头擦拭后点燃灭菌), 用灭菌的卫生开罐刀开启(带汤汁的罐头开启前适当振摇)。对于固体试样, 取 25g 于 225 ml 灭菌蛋白胨水中均质混匀。

1.4.2 加样

用移液枪吸取试样各 5ml, 加入到装有 5ml Bimedia002A 培养液的检测瓶中, 各加 4 个平行, 加完试样后在培养瓶上注明试样标记。

1.4.3 留样

用移液枪或其他适当工具以无菌操作取出内容物 25~50ml(g), 移入灭菌容器内, 保存于 4℃ 冰箱中, 待该批样罐检验得出结论后可以弃去。

1.4.4 电阻抗法检测

按照仪器操作说明使 BacTrac4300 处于正常工作状态, 设定孵育温度为 36℃、测量持续时间为 72h。将接种好试样的培养瓶放入仪器培养箱中, 其中两个平行旋紧瓶盖, 另两个平行旋松瓶盖 1/4 至 1/2 圈。当到达测量持续时间时, 如果测量结果 IDT 值 > 0, 表明培养瓶中有微生物生长, 将该瓶培养液以及该试样的留样按 GB/T4789.26 中的 6.9~6.11 项进行验证实验, 如果经验证实验确证无微生物增殖现象, 则为商业无菌; 经验证实验确证有微生物增殖现象, 则为非商业无菌。如 IDT 无显示数值, 经感官检查、pH 值测定、涂片镜检, 确证无微生物增殖现象, 则为商业无菌。

1.4.5 感官检查和 pH 值测定

在光线充足、空气清洁无异味的检验室中, 将罐头内容物倾入白色搪瓷盘内, 对产品的外观、色泽、状态和气味等进行观察和嗅闻, 用餐具按压食品或戴薄膜手套以手指进行触感, 鉴别食品有无腐败变质的迹象, 并测定 pH 值。

2 结果与分析

2.1 临界值

2.1.1 预实验

将 7 种实验菌株用电阻抗法检测后, 发现菌株

的 M 值曲线相对于 E 值曲线更类似于微生物的生长曲线(图 1),因此确定以 M 值作为检测信号值。

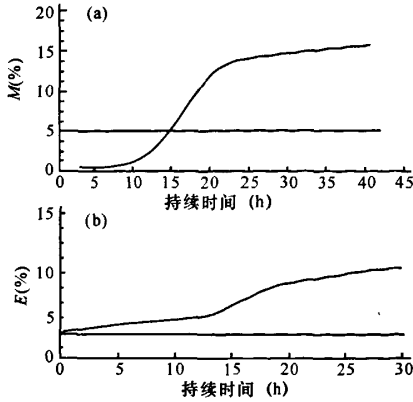


图 1 金黄色葡萄球菌的 M 值曲线(a)和 E 值曲线(b)

2.1.2 重现性实验

以金黄色葡萄球菌为代表菌进行实验,从图 2 可知金黄色葡萄球菌在 72h 内最大漂移值为 $M = 1.25\%$,其在 $M = 5\%$ 有良好的重现性。因考虑到罐头食品的成分较复杂,会有一定的基线漂移,故确定 $M = 5\%$ 作为临界值。

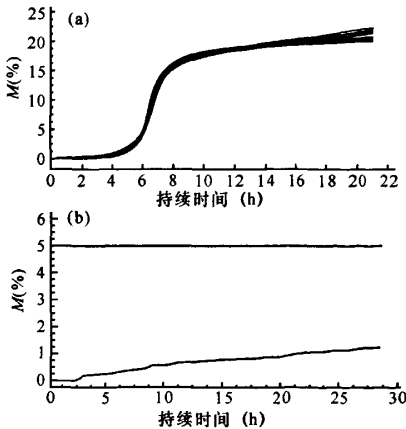


图 2 M 值重现性(a)及基线(b)

2.2 电阻抗法的应用条件

2.2.1 适用性

将实验菌株同时进行电阻抗法和平板计数法检测后,7 种实验菌株的回归方程及参数如表 1 所示。

由表 1 可见,BacTrac4300 对生长特性各不相同的菌株均能灵敏、快速、准确地检测出来,具有广泛的适用性,适用于污染菌来源不明确的罐头商业无菌的检测。由标准曲线图还可明显的看出,菌数越高,检测时间越少,菌数越低,检测时间越长。当菌数为零时,检测时间无显示数值。这也可为罐头食品加

样量的确定提供依据。

表 1 7 种实验菌株的回归方程及参数

菌株	回归方程	相关系数	离差
大肠杆菌	$y = -0.682x + 7.0023$	-0.9719	0.19
枯草芽孢杆菌	$y = -0.0927x + 2.9365$	-0.9534	0.233
沙门氏菌	$y = -0.4169x + 5.4081$	-0.9567	0.254
蜡状芽孢杆菌	$y = -0.6407x + 6.6375$	-0.9544	0.222
金黄色葡萄球菌	$y = -0.1701x + 4.1195$	-0.975	0.173
粪链球菌	$y = -0.2177x + 4.4448$	-0.9696	0.299
生孢梭菌	$y = -0.3821x + 4.2363$	-0.9508	0.244

2.2.2 灵敏度

罐头食品即使被污染后,含菌量也很低,因此需检验 BacTrac4300 的电阻抗法的灵敏度,以验证其是否适用于商业无菌的检测。将菌悬液系列稀释后,作 5 次重复测试,由表 2 可见平均计数结果为 1~4CFU/ml,实验菌株的 5 个平行值间无显著差异 ($P > 0.05$)。理论上液体样品的检测限是 $>1\text{CFU/ml}$,而固体样品的理论检测限是 $>10\text{CFU/g}^{[6]}$,表 2 结果表明在菌落数很少的情况下,Bactrac4300 均能很灵敏地检测出来。

表 2 灵敏度的实验结果

菌株	平板计数 (CFU/ml)	IDT 值 (h)					P 值
		1	2	3	4	5	
大肠杆菌	2	9.77	10.22	9.96	10.15	10.07	>0.05
枯草芽孢杆菌	2	28.61	27.84	29.76	28.91	28.09	>0.05
沙门氏菌	1	12.95	12.65	12.97	12.71	13.53	>0.05
蜡状芽孢杆菌	4	9.93	9.63	9.72	9.58	9.76	>0.05
金黄色葡萄球菌	3	21.14	22.4	21.38	20.96	21.53	>0.05
粪链球菌	4	17.62	17.38	17.47	17.71	17.12	>0.05
生孢梭菌	4	22.23	22.13	22.73	22.91	22.84	>0.05

2.2.3 测量持续时间

表 3 所示为 7 种实验菌株为 1CFU 时的最大 IDT 值,可见最大不超过 36h。由于一般微生物 95% 可在 24h 内回复生长,98% 可在 72h 内回复生长^[7],为了保证实验不出现假阴性,我们将测量持续时间定为 72h。

2.2.4 加样量

由于罐头食品含菌量低,尽可能地加大加样量可提高试样的含菌量,提高检测的灵敏度,缩短检测时间。根据仪器操作手册,样品可加载体积为 1~5 ml,故将加样量定为 5ml。

表3 1CFU 实验菌株的最大 IDT 值

菌株名称	最大 IDT(h)
大肠杆菌	10.66
枯草芽孢杆菌	35.22
沙门氏菌	13.53
蜡状芽孢杆菌	10.21
金黄色葡萄球菌	23.81
粪链球菌	22.08
生孢梭菌	24.79

2.3 样品检测结果

对同一批生产的 90 个罐头,取 30 罐用 Bactrac4300 进行检测,30 罐按 GB/T 4789.26 保温观察,30 罐常温放置作为对照,结果如表 4 所示。

表4 低酸性罐头样品的检测结果

编号	样品名称	Bactrac4300 电阻抗法检测				GB/T4789.26 保温观察		
		pH 值	IDT(h) (需氧)		IDT(h) (厌氧)		保温观察	pH 值
			1	2	1	2		
1	甜玉米	5.77	无	无	无	无	无胖听,泄漏	5.77
2	甜玉米	5.74	无	无	无	无	无胖听,泄漏	5.74
3	八宝粥	6.05	无	无	无	无	无胖听,泄漏	6.05
4	八宝粥	6.03	无	无	无	无	无胖听,泄漏	6.04
5	八宝粥	6.08	无	无	无	无	无胖听,泄漏	6.08
6	淡奶	5.83	无	无	无	无	无胖听,泄漏	5.83
7	淡奶	5.82	无	无	无	无	无胖听,泄漏	5.82
8	椰浆	6.36	无	无	无	无	无胖听,泄漏	6.36
9	椰浆	6.37	无	无	无	无	无胖听,泄漏	6.37
10	红腰豆	5.33	无	无	无	无	无胖听,泄漏	5.33
11	红腰豆	5.32	无	无	无	无	无胖听,泄漏	5.32
12	蘑菇	4.98	无	无	无	无	无胖听,泄漏	4.98
13	蘑菇	4.96	无	无	无	无	无胖听,泄漏	4.96
14	豆豉海鱼	5.84	无	无	无	无	无涨袋,泄漏	5.83
15	豆豉海鱼	5.26	4.85	5.05	无	无	无胖听,泄漏	5.09
16	豆豉鲑鱼	5.00	8.00	7.97	无	无	无胖听,泄漏	4.85
17	豆豉鲑鱼	5.82	无	无	无	无	无胖听,泄漏	5.82
18	火腿肠	6.12	无	无	无	无	无涨袋,泄漏	6.12
19	淀粉肉肠	6.09	7.80	8.01	无	无	无涨袋,泄漏	6.08
20	榨菜	4.77	13.64	13.69	无	无	无涨袋,泄漏	4.77
21	榨菜	4.77	无	无	无	无	无涨袋,泄漏	4.77
22	热狗肠	5.93	12.71	13.71	无	无	无涨袋,泄漏	5.92
23	玉米肉肠	6.01	无	无	无	无	无涨袋,泄漏	6.01
24	玉米肉肠	6.00	无	无	无	无	无涨袋,泄漏	6.00
25	香辣鲑鱼	5.04	5.54	6.44	无	无	无胖听,泄漏	5.00
26	香辣鲑鱼	5.82	5.54	6.44	无	无	无胖听,泄漏	5.82
27	鱼仔	5.62	8.82	8.62	无	无	无涨袋,泄漏	5.51
28	麻辣鱼仔	5.84	无	无	无	无	无涨袋,泄漏	5.84
29	麻辣鱼仔	5.83	无	无	无	无	无涨袋,泄漏	5.83
30	香辣鱼仔	5.74	无	无	无	无	无涨袋,泄漏	5.73

30 份试样按 GB/T4789.26 保温观察,所有样

品未见胖听、涨袋、泄漏和感官异常,15、16、25 号 3 个样品 pH 值偏酸,且镜检发现有异常数量的细菌,按 GB/T4789.26 的 6.10~6.11 项进一步进行检验后发现均为嗜温性需氧芽孢杆菌,因此可判定其余 27 个样品为商业无菌。而 Bactrac4300 电阻抗法的测试结果中有 7 份试样检出有微生物增殖。为了确认电阻抗法的准确性,对阳性测量瓶和留样按 GB/T4789.26 进行验证实验,结果均为嗜温性需氧芽孢杆菌。

由此可见,GB/T4789.26 保温方法对低酸性罐头食品商业无菌的检测存在假阴性,传统方法存在着一些漏洞,而电阻抗法检测结果更为准确。

3 结束语

本实验应用电阻抗法建立了快速检测低酸性罐头食品商业无菌的方法,与传统方法相比,该方法快速、灵敏、准确、可靠,且操作简单、使用方便。应用电阻抗法全部检测过程可在 3d 内完成,比传统方法缩短了 7d 时间,减少了保温大量罐头所需的恒温设备,并具有自动化、现代化、多功能性和连续“实时”样本检测的特点,该方法必将在低酸性罐头食品商业无菌的快速检测中发挥积极的作用。

参考文献:

- [1] GB/T 4789.26-2003. 罐头食品商业无菌的检验[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [2] FAO. Food and Nutrition paper; Manual of food quality control 4 No 14/14; Microbiological analysis (Processor meat and canned foods)[M]. Washington, DC: Food & Agriculture Org, 1994:320.
- [3] FDA. Bacteriological analytical manual[M/CD], AOAC International, 1998: Chapter 21A.
- [4] AOAC. Official method of analysis (14th edn)[M]. Washington, DC: AOAC, 1984: 46. 063-46. 070.
- [5] 奥地利 SY-LAB 公司. 微生物自动快速检测系统 BacTrac4300 使用说明书[R]. 2002.
- [6] 奥地利 SY-LAB 公司. 微生物自动快速检测系统 BacTrac4300 操作手册 [R/CD]. Austria: Sy-Lab Instruments GmbH, 2002: 乳、乳制品及冰激凌.
- [7] 郑晶, 黄晓蓉, 陈彬, 等. BacT/ALERT 3D 在罐头商业无菌检测的应用[J]. 食品安全导刊, 2008(4): 50-52.

(责任编辑:韦廷宗)