



中华人民共和国国家标准

GB 4789.43—2016

食品安全国家标准 食品微生物学检验 微生物源酶制剂抗菌活性的测定

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布
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

微生物源酶制剂抗菌活性的测定

1 范围

本标准规定了微生物源酶制剂抗菌活性的测定方法。
本标准适用于用微生物生产的酶制剂抗菌活性的测定。

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:

- 2.1 生物安全柜。
- 2.2 冰箱:2℃~5℃。
- 2.3 恒温培养箱:36℃±1℃。
- 2.4 恒温水浴箱:46℃±1℃。
- 2.5 天平:感量为0.1g。
- 2.6 振荡器。
- 2.7 无菌吸管:1mL(具0.01mL刻度)、10mL(具0.1mL刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.8 无菌培养皿:直径90mm。
- 2.9 无菌锥形瓶:容量250mL、500mL。
- 2.10 pH计或精密pH试纸。
- 2.11 无菌纸片:见A.8。
- 2.12 无菌镊子。
- 2.13 游标卡尺:刻度为0.1mm。

3 培养基和试剂

- 3.1 胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptone Soy Agar, TSA):见A.1。
- 3.2 胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptone Soy Broth, TSB):见A.2。
- 3.3 平板计数琼脂(Plate Count Agar):见A.3。
- 3.4 0.1mol/L HCl:见A.4。
- 3.5 无菌生理盐水:见A.5。
- 3.6 50.0μg/mL环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)溶液:见A.6。
- 3.7 5.0μg/片环丙沙星纸片:见A.7。

4 试验菌株

- 4.1 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538。

- 4.2 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC 11229。
 4.3 蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) ATCC 2。
 4.4 环状芽胞杆菌(*Bacillus circulans*) ATCC 4516。
 4.5 化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) ATCC 12344。
 4.6 粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*) ATCC 14041。

5 检验程序

微生物源酶制剂抗菌活性的测定检验程序见图 1。

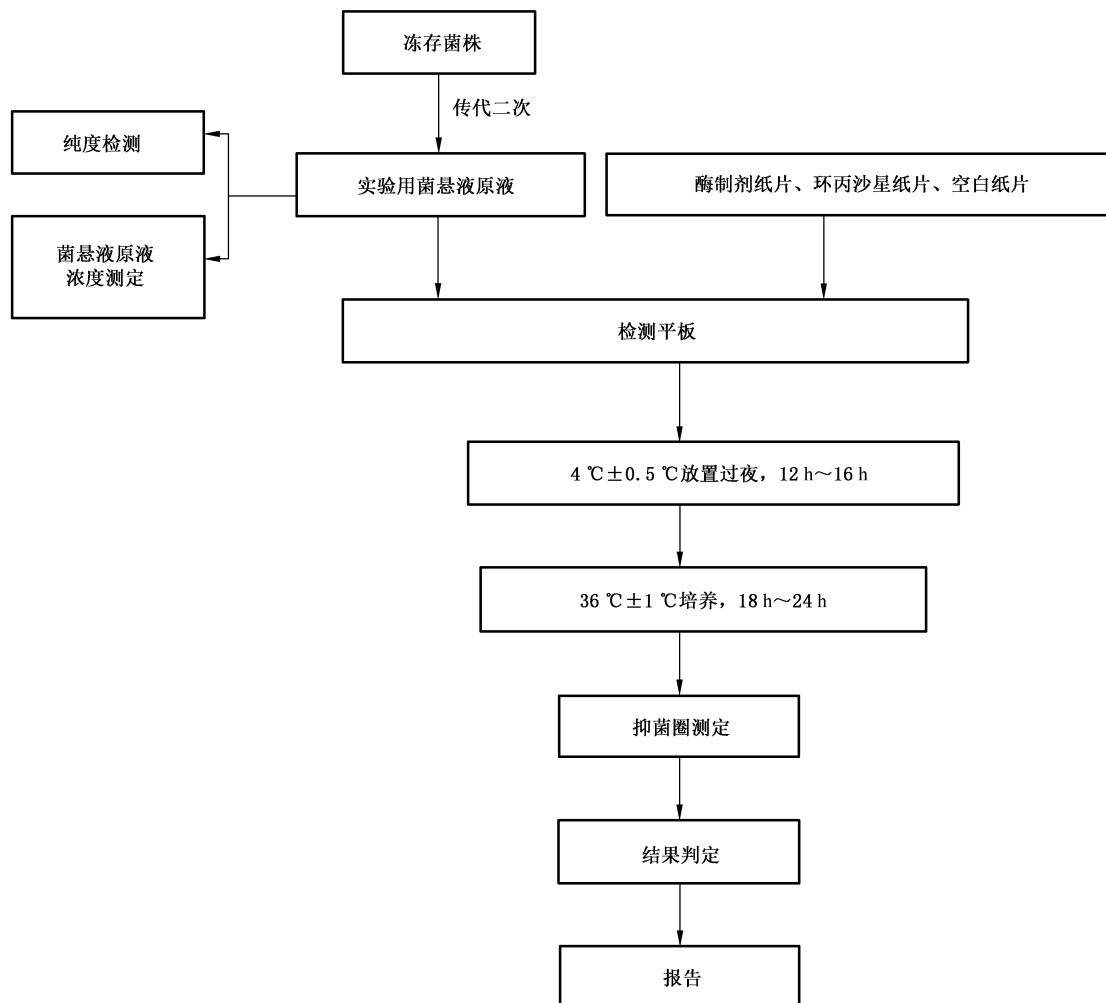


图 1 微生物源酶制剂抗菌活性的测定检验程序

6 操作步骤

6.1 试验菌悬液原液制备

将金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠埃希氏菌(ATCC 11229)、蜡样芽胞杆菌(ATCC 2)、环状芽胞杆菌(ATCC 4516)、化脓性链球菌(ATCC 12344)、粘质沙雷菌(ATCC 14041)冻存菌株分别接种于

盛有 5 mL TSB 的试管,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h 进行第一次传代培养,分别挑取第一次传代培养液 1~2 环转种于 5 mL TSB 肉汤,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h 进行二次传代培养,作为试验菌悬液原液备用。

试验菌悬液原液纯度检测:分别挑取试验菌悬液原液各一环,划线接种于 TSA 平板, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h~24 h,观察纯度。

6.2 菌悬液原液浓度测定

6.2.1 菌悬液原液稀释

分别取 6.1 中制备的菌悬液原液依次进行十倍梯度稀释,蜡样芽孢杆菌和环状芽孢杆菌分别制成 10^{-4} 稀释液,金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、化脓性链球菌、粘质沙雷菌分别制成 10^{-5} 稀释液。

6.2.2 培养计数

分别吸取 6.2.1 中制备好的各菌稀释液 1 mL 于无菌平皿内,每个稀释度做两个平行,并用无菌生理盐水作空白对照。向平皿中倾注冷却至 $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右(可放置于 $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴箱中保温)的平板计数琼脂 15 mL~20 mL,并转动平皿使其混合均匀。待琼脂凝固后,将平板翻转,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后计数,各菌悬液原液中菌浓度均大于 10^6 CFU/mL 时方可使用。

6.3 检测平板制备

倾注融化并冷却至 $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 TSA 培养基 15 mL 于无菌培养皿内,待其凝固后制成 TSA 平板,备用。

将 6.1 中二次传代后的各菌培养物分别用冷却至 $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 TSA 培养基按 1:10 的比例稀释(其中化脓性链球菌 ATCC 12344 按 1:20 的比例稀释),充分混匀后各取 10 mL 至上述已制备好、于 $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中保温的 TSA 平板内,轻轻摇动平板使菌液均匀铺平,待其凝固后制成检测平板,备用。

注:为防止含菌培养基遇到 TSA 后马上凝固,引起菌悬液铺板不均匀,菌悬液铺板前应先将 TSA 平板置于 $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保温平衡 10 min。

6.4 酶制剂纸片的制备

准确称(移)取 1.0 g(mL)酶制剂于 9 mL 无菌生理盐水中,充分混匀后制成 10% 的酶制剂溶液。将无菌纸片放入无菌平皿内,在每张纸片上缓缓滴加 100 μL 10% 的酶制剂溶液,使其全部吸收,每种酶制剂样品制备 12 张纸片。

6.5 贴纸片及培养

将 6.4 中制备的含待测酶制剂的纸片、含环丙沙星的阳性对照纸片(见 A.7)和含 100 μL 无菌生理盐水的空白阴性对照纸片用无菌镊子分别置 6.3 中制备的检测平板上,每个平板贴 2 张纸片(2 张含待测酶制剂的纸片或 2 张含环丙沙星的纸片或 2 张空白纸片),两纸片圆点的间距大于 32 mm,每个标准菌株分别设一阳性对照和一阴性对照平板。将平板正置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内过夜(12 h~16 h)。第二天转入 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24 h 后,测定酶制剂样品、环丙沙星和阴性对照纸片形成的抑菌圈。

7 抗菌活性结果报告

7.1 结果判定

若待测酶制剂对 3 种或 3 种以上受试微生物呈现出抗菌活性,即纸片周围出现清晰可见的抑菌圈

(每个抑菌圈直径 ≥ 16 mm),且阳性对照环丙沙星纸片对金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、粘质沙雷菌、环状芽孢杆菌、化脓性链球菌 5 种细菌形成的抑菌圈均 > 16 mm,则判定该酶制剂样品中存在抗菌活性物质。

7.2 结果报告

报告样品中检出抗菌活性或未检出抗菌活性。

附 录 A 培养基与试剂

A.1 胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptone Soy Agar, TSA)

A.1.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂粉	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述各成分加于蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装至锥形瓶中,121 °C 灭菌 15 min。

A.2 胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptone Soy Broth, TSB)

A.2.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将上述各成分加于蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装试管,121 °C 灭菌 15 min。

A.3 平板计数琼脂(Plate Count Agar, PCA)

A.3.1 成分

胰蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	2.5 g
葡萄糖	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

上述各成分加于蒸馏水中,煮沸溶解,调节 pH 至 7.2 ± 0.2 ,分装至锥形瓶中,121 °C 灭菌 15 min。

A.4 0.1 mol/L HCl

A.4.1 成分

HCl	9 mL
蒸馏水	991 mL

A.4.2 制法

移取浓盐酸 9 mL(质量浓度为 36%,密度为 1.17 g/m³),用无菌蒸馏水稀释至 1 000 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后备用。

A.5 无菌生理盐水

A.5.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水,121 °C 灭菌 15 min。

A.6 50.0 μg/mL 环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)

A.6.1 成分

1 000 μg/mL 环丙沙星	0.5 mL
无菌生理盐水	9.5 mL

A.6.2 制法

按产品说明书(百分比,含水量或效价)称取一定质量的环丙沙星用适量 0.1 mol/L HCl 溶解使其浓度为 1 000 μg/mL,无菌条件下 0.22 μm 微孔滤膜过滤后移取 0.5 mL,用无菌生理盐水稀释至 10 mL,混匀。

A.7 5.0 μg/片环丙沙星纸片(Ciprofloxacin paper, CIP paper)

A.7.1 成分

50.0 μg/mL 环丙沙星	100 μL
无菌纸片	1 张

A.7.2 制法

吸取 50.0 μg/mL 环丙沙星溶液 100 μL 缓慢均匀滴加于无菌纸片上,制成 5.0 μg/片环丙沙星纸片。

A.8 无菌纸片

A.8.1 要求

纸片外观应整洁、无毛边,无明显变形,无破损,pH 为中性,厚度 0.3 mm~0.6 mm,60 s 内吸收 100 μ L 蒸馏水。

A.8.2 制备及储存方法

制成标准直径为 13.0 mm \pm 0.1 mm 的圆形纸片,置玻璃容器内,密封,121 $^{\circ}$ C 灭菌 15 min 后,80 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C 干燥 4 h,备用。
