

《食品微生物学检验 商业无菌快速检测 实时光电法》

编制说明

目 录

一、工作简况	3
1. 任务来源	3
2. 主要工作过程	3
3. 主要参加单位和工作组成员及其所做的工作	3
二、标准编制原则和主要研究内容	4
1. 编制原则	4
2. 主要研究内容	4
三、主要试验（或验证）情况	5
1. 灵敏度研究（Sensitivity Study）	5
2. 相对检出限（RLOD）研究	10
3. 包容性研究	12
4. 联合实验室间研究	14
5. 国内实验室间验证数据	15
四、标准中涉及到的专利和知识产权的说明	16
五、产业化情况和推广应用论证	17
六、与国际、国外对比情况	17
七、与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性	17
八、重大意见分歧的处理经过和依据	17
九、贯彻标准的要求和措施建议	17
十、废止现行相关标准的建议	17
十一、其他应予说明的事项	17

一、工作简况

1. 任务来源

本文件由中国出入境检验检疫协会提出并归口，中国海关科学技术研究中心作为本文件组织协调单位。根据中国出入境检验检疫协会团体标准化工作委员会 2022 年第一批团体标准制修订计划，由中国海关科学技术研究中心、内蒙古伊利实业集团股份有限公司、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、纽勤生物科技（上海）有限公司、光明乳业股份有限公司、君乐宝集团、杭州味全食品有限公司、维益食品、四川菊乐食品股份有限公司、广州风行乳业股份有限公司等单位共同参与起草，计划于 2022 年底前完成该标准的制定工作。

2. 主要工作过程

2022 年 6 月~2022 年 7 月：提出制定标准项目，并进行了标准立项征求意见和论证工作；

2022 年 7 月：中国出入境检验检疫协会公布计划项目；

2022 年 8 月：进行前期调研、存在问题分析和相关资料收集整理等准备工作，拟定了标准“编制说明”编写大纲，并起草了“标准草案”；

2022 年 9 月：召开标准启动会，围绕标准草案进行讨论

2022 年 10 月：按照启动会专家意见和建议修改标准草案，形成标准“征求意见稿”；

2022 年 10 月~2022 年 11 月：公开征求意见，对征求到的意见进行分类采纳处理，形成“标准送审稿”；

2022 年 11 月：召开标准审定会，根据与会专家的意见，对标准送审稿进行修改完善，形成标准报批稿，将标准报批稿和标准说明一并上报中国出入境检验检疫协会审批；

2022 年 12 月：标准发布。

3. 主要参加单位和工作组成员及其所做的工作

项目责任单位：纽勤生物科技（上海）有限公司。

项目参与单位：内蒙古伊利实业集团股份有限公司、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、光明乳业股份有限公司、君乐宝集团、杭州味全食品有限公司、维益食品、四川菊乐食品股份有限公司、广州风行乳业股份有限公司。

本标准主要起草人：魏海燕、王云封、朱卿睿、黄炎、安娜、李志君、孙英丽、马利军、李雪晶、张慧萍、陈政晓、黄亚芳、张耀广、肖述涛、韩兰柱、沈莉、陈胜楠。

二、标准编制原则和主要研究内容

1. 编制原则

全国人大常委会在 2017 年 11 月 4 日审议通过新修订的《标准化法》，该法第二条规定：“标准包括国家标准、行业标准、地方标准和团体标准、企业标准。”从法律上进一步明确了团体标准地位。我国现行的法规体系中，国家标准、行业标准、地方标准属于政府标准，由政府主导制定；团体标准和企业标准属于市场标准，由市场自主制定。政府标准与市场标准协同发展、协调配套。市场标准除了快速反应市场需求外，其承载的一个重要功能就是创新。

本标准基于 GB/T 1.1《标准化工作导则》、GB/T 20000《标准化工作指南》等系列标准的要求，结合我国食品安全发展实际与国内外验证结果，对标准适用范围、检验步骤、电子化报告等关键要素进行明确。

现行 GB 4789.26-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验》测试周期需要 10 天保温后进行感官检查、pH 测定和涂片染色镜检，检测时间长，判定方法对实验人员专业技能要求较高，可溯源性难以保证，在一定程度上制约了企业放货速度，不利于规模化企业的质量控制管理。实时光电法是基于微生物生长代谢带来的 pH 值变化及其他生物反应来确定是否存在微生物的一种方法。具有缩短测试时间、提高测试效率、超标产品提前预警等特点。

2. 主要研究内容

Soleris®实时光电方法用于食品商业无菌的快速筛查。该方法使用专用测试瓶，加入待测样品，在测试过程中，微生物生长繁殖产生的 CO₂ 可使测试瓶底部的琼脂栓颜色由绿色变为黄色，该颜色变化过程被 Soleris®系统实时识别和记录，报告定性二元结果，判定所测产品是否为商业无菌。相比现行国家标准方法 GB 4789.26-2013 测试周期至少缩短 7 天，因此可更早地提示风险。

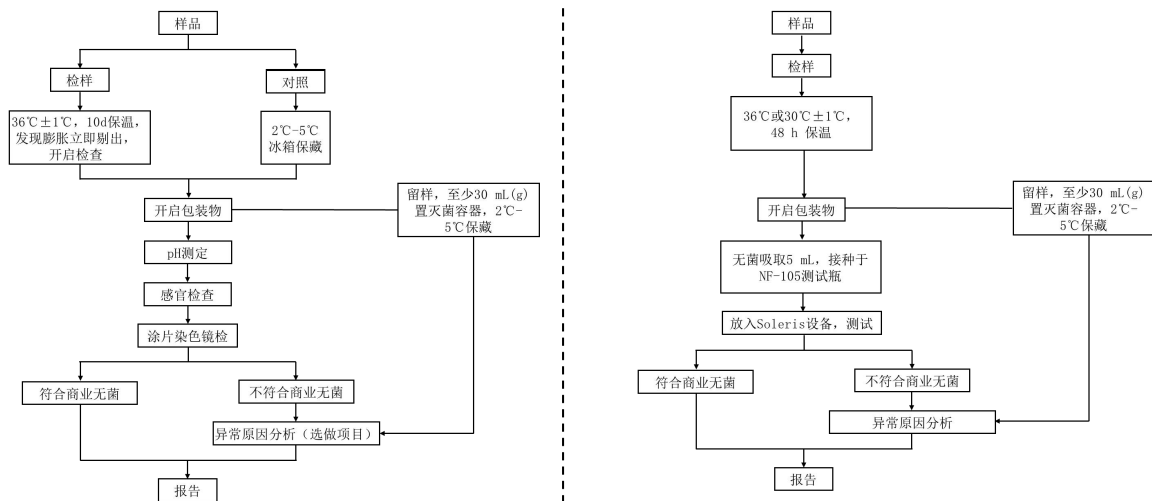


图 1 Soleris®实时光电法（右）和 GB 4789.26-2013（左）操作流程概览

本标准适用于低酸性罐藏食品和酸性罐藏食品的商业无菌快速筛查。

本标准的制定旨在协助企业建立 Soleris®实时光电法商业无菌快速筛查检验方法，同时引入电子记录规范以赋能实验室数字化升级。主要技术内容说明如下：

（1）本标准所采用的方法为商业无菌检验快速筛查方法。包装完好的产品 在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保温 2 天（低酸性罐藏食品保温温度为 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，酸性罐藏食品保温温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ），随后取内容物 5 mL 加入商业无菌专用测试瓶 NF-105 中，上机测试 24 h 即可完成全部测试流程。Soleris®实时光电微生物快速检测系统、测试瓶 NF-105 为专利产品，受到美国专利保护；

（2）本标准使用的软件符合 GB/T 30644 标准要求的控制软件创建、修改、维护或导出检验电子记录，以确保电子记录的真实性、完整性和保密性。以确保实验结果真实可溯源，助力企业检测数据安全能力建设。

（3）本标准中的附录给出了典型曲线形态和异常报警人工核查方案，以帮助实验人员更好地理解检验原理，核实检验结论。

三、主要试验（或验证）情况

1. 灵敏度研究（Sensitivity Study）

灵敏度研究是指参考方法或替代方法（Soleris®实时光电法）检出目标微生物的能力。

商业无菌产品中，乳制品及其替代品占较高市场份额，因此选取 UHT 灭菌乳、UHT 植物奶和 UHT 调制乳，共计 60 个样品进行验证。灭菌乳：以生牛（羊）乳为原料，添加或不添加复原乳，在连续流动的状态下，加热到至少 $132\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并保持很短时间的灭菌，再经无菌灌装等工序制成的液体产品。植物奶：用含蛋白质和脂肪的植物种子（如大豆、核桃、花生等）或果实（如椰子等）制成的饮品。调制乳：以不低于 80 % 的生牛（羊）乳或复原乳为主要原料，添加其他原料或食品添加剂或营养强化剂，采用适当的杀菌或灭菌等工艺制成的液体产品。

表 1 展示了样品设置和样品数量。

表 1 样品设置

类别	基质	阳性样本数	阴性样本数	总计
UHT 灭菌乳和代乳饮料	UHT 灭菌乳	10	10	20
	UHT 植物饮料	10	10	20

	UHT 调制乳	10	10	20
总计		30	30	60

样品制备:

由于本验证实验涉及商业无菌检测，由于食品基质原因，人为使用受污染的样品来达到所需的阳性样品数量。在接种之前，对阳性添加微生物采用适当的损伤方案，例如 55 °C±1 °C，5 min 热处理或 100 mM 过氧化氢 (H₂O₂) 20 min 等，具体见表 2。损伤程度通过在合适的选择性与非选择性平板上进行计数来确定，接受目标：大于 0.5log 差异。对于没有特定选择性培养基的微生物，使用添加盐的非选择性琼脂来确定研究中使用的菌株的损伤水平。

损伤方法:

- (A). 55 °C±1 °C 热处理 5 min;
- (B). 100 mM 过氧化氢处理 10 min;
- (C). 65 °C±1 °C 热处理 10 min;
- (D). 60 °C±1 °C 热处理 10 min;
- (E). 65 °C±1 °C 热处理 5 min;
- (F). 100 mM 过氧化氢处理 15 min;
- (G). 100 mM 过氧化氢处理 20 min;
- (H). 500 mM 过氧化氢处理 10 min;

具体样品的人工污染情况见表 2。

样品阳性添加后，36 °C±1 °C 下保温 48 h，使用 Soleris[®]和参考方法对保温后样品进行测试。参考方法选择：《牛奶和奶制品卫生操作法典》(CAC/RCP 57-2004)，附件 B 超高温灭菌处理的杀菌控制措施 第 2.2 节 过程管理。测试原始数据详见表 2。

表 2 灵敏度研究

样品编号	类别	基质	菌株	损伤方法	损伤结果 (log 10)	阳性添加水平 (CFU/L)	参考方法结果	Soleris [®] 结果	
								测试时间	结果判定

1	UHT 灭菌 乳	脱脂 牛奶	成团泛菌	A	0.5	2.3	+	6.8	+
2		英式 全脂 牛奶	成团泛菌	A	0.5	2.3	+	6.8	+
3		脱脂 牛奶	病臭肠球菌	A	1	1.6	+	6.8	+
4		商业 无菌 奶	病臭肠球菌	A	1	1.6	+	22.5	+
5		商业 无菌 奶	德尔布有孢圆酵母	A	1	2.8	+	13.6	+
6		商业 无菌 脱脂 奶	枯草芽孢杆菌	B	0.5	4.0	+	6.8	+
7		商业 无菌 奶	枯草芽孢杆菌	B	0.5	4.0	+	23.3	+
8		商业 无菌 奶	产气荚膜梭菌	A	1	1.8	+	6.8	+
9		商业 无菌 奶	凝结芽孢杆菌	C	0.3	2.2	+	6.7	+
10		商业 无菌 脱脂	凝结芽孢杆菌	C	0.3	2.2	+	6.7	+

		奶							
11	UHT 植物 饮料	植物 饮品	藤黄微球菌	D	0.7	1.9	+	6.8	+
12		无糖 豌豆 奶	藤黄微球菌	D	0.7	1.7	+	6.8	+
13		豌豆 奶	克鲁斯氏念珠菌	E	1	1.0	+	6.8	+
14		无糖 豆奶	克鲁斯氏念珠菌	E	1	1.0	+	10.1	+
15		杏仁 奶	抗坏血酸克吕沃尔 菌	B	1	1.7	+	7.5	+
16		加糖 豆奶	短芽孢杆菌	C	1	1.8	+	6.7	+
17		大豆 奶油 替代 物	短芽孢杆菌	C	1	1.8	+	6.7	+
18		无糖 燕麦 奶	纯黄丝衣霉	F	0.5	1.3	+	18.7	+
19		燕麦 奶	纯黄丝衣霉	F	0.5	1.3	+	7.5	+
20		腰果 饮料	纯黄丝衣霉	F	0.5	1.3	+	6.8	+
21	UHT 调制 乳	巧克 力奶	英诺克李斯特氏菌	A	0.7	1.0	+	6.8	+
22		草莓 味奶	英诺克李斯特氏菌	A	0.7	1.0	+	6.8	+

		昔								
23		焦糖 蛋白 饮料	嗜水气单胞菌	B	1	2.8	+	6.8	+	
24		草莓 奶昔	产酸克雷伯氏菌	B	1	2.8	-	6.8	+	
25		焦糖 蛋白 奶昔	产酸克雷伯氏菌	B	1	1.8	+	6.8	+	
26		巧克 力奶 昔	韦氏芽孢杆菌	G	0.3	1.8	+	6.7	+	
27		香草 奶昔	韦氏芽孢杆菌	G	0.3	2.0	+	6.7	+	
28		草莓 牛奶	短小芽孢杆菌	H	0.5	1.4	+	24.5	+	
29		软糖 布朗 尼牛 奶	浸麻类芽孢杆菌	E	1	1.0	-	17.3	+	
30		巧克 力牛 奶	浸麻类芽孢杆菌	E	1	1.0	+	6.7	+	

灵敏度研究数据汇总见表 3:

表 3 灵敏度研究数据汇总

类别	基质	PA	NA	PD	ND	FP	SE alt(%)	SE ref(%)	RT(%)	FPR(%)
UHT 灭 菌乳和代 乳饮料	UHT 灭菌乳	10	10	0	0	0	100.0	100.0	100.0	0.0
	UHT 植物饮料	10	10	0	0	0	100.0	100.0	100.0	0.0
	UHT 调制乳	8	10	2	0	0	100.0	80.0	96.7	0.0

	总计	28	30	2	0	0	100.0	93.3	96.7	0.0
--	----	----	----	---	---	---	-------	------	------	-----

PA: Soleris®结果和参考方法阳性结果一致的样品数量。

NA: Soleris®结果和参考方法阴性结果一致的样品数量。

PD: 阳性偏差的样品数量, Soleris®结果阳性, 参考方法阴性。

ND: 阴性偏差的样品数量, Soleris®结果阴性, 参考方法阳性。

FP: 假阳性的样本数。

alt: Soleris®方法。

ref: 参考方法。

SE: 相对灵敏度。

RT: 相对真实度。

FPR: 假阳性比。

其中阳性偏离原因分析见表4, 两种基质均接种了低浓度微生物。

表4 阳性偏离原因分析

类别	基质	样品编号	Soleris®实时光电法结果	接种微生物和接种量 (CFU/样品)
UHT 灭菌乳和代乳饮料	UFIT 草莓蛋白奶昔	54	阳性	产酸克雷伯氏菌/2.8
	穆勒 Frijj 巧克力软糖牛奶	59	阳性	浸麻类芽孢杆菌/1.0

根据 ISO 16140-2: 2016 相关规定, 灵敏度 ND-PD 的可接受限为 3, 本次实验 ND-PD=-2。

结论: Soleris®实验结果符合非配对设计实验等效性要求。

2. 相对检出限 (RLOD) 研究

相对检出限 (RLOD) 是指替代方法的检出水平与参考方法的检出水平在两种方法检出概率 $P=0.50$ 时的比值。

基于乳品大类以及在验证实验中, 该食品类别相关的微生物进行 RLOD 评估。因此, 基质选择全脂牛奶, 污染微生物为来源于巴氏杀菌乳的成团泛菌 (CRA 17030, NCIMB 702072), 并进行 $55\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 min 热胁迫处理后人工污染样品。

人工污染, 进行三种污染浓度: 即阴性对照, 无接种, 5 个测试; 低浓度污染, 1 CFU/L, 10 个测试; 0.65 CFU/L, 10 个测试, 得到部分检出水平; 高浓度污染, 3.3 CFU/L, 2 个测试;

4.3 CFU/L, 3 个测试。

样品阳性添加后, 36 °C±1 °C下保温 48 h, 使用 Soleris[®]和参考方法对保温后样品进行测试。
参考方法选择: 《牛奶和奶制品卫生操作法典》(CAC/RCP 57-2004), 附件 B 超高温灭菌处理的杀菌控制措施 第 2.2 节 过程管理。测试原始数据详见表 5。

基于 ISO 16140-2: 2016 计算 RLOD 值。

表 5 LOD 测试值原始数据

样品	类别	阳性添加浓度(CFU/L)	Soleris [®] NF-105 分析		参考方法	
			测试时间	最终结果	mPCA 结果	最终结果
1	阴性对照	NA	ND	-	<1	-
2		NA	ND	-	<1	-
3		NA	ND	-	<1	-
4		NA	ND	-	<1	-
5		NA	ND	-	<1	-
6	低浓度	1	ND	-	<1	-
7		1	ND	-	400	+
8		1	6.8	+	2	-
9		1	9.8	+	<1	-
10		1	ND	-	<1	-
11		1	44.7	+	1.30×10 ⁵	+
12		1	9.9	+	8.00×10 ⁴	+
13		1	ND	-	2.30×10 ⁴	+
14		1	ND	-	<1	-
15		1	ND	-	500	+
16		0.65	ND	-	1.10×10 ⁶	+
17		0.65	14.2	+	8.00×10 ⁶	+
18		0.65	ND	-	<1	-
19		0.65	6.8	+	<1	-
20		0.65	6.8	+	1.50×10 ³	+
21		0.65	ND	-	8.00×10 ⁷	+

22	高浓度	0.65	6.8	+	2.40×10^8	+
23		0.65	6.8	+	7.90×10^5	+
24		0.65	6.8	+	7.60×10^8	+
25		0.65	6.8	+	1.60×10^8	+
26		3.3	6.8	+	2.00×10^7	+
27		3.3	6.8	+	1.90×10^3	+
28		4.3	6.8	+	1.10×10^6	+
29		4.3	6.8	+	6.70×10^5	+
30		4.3	6.8	+	1.00×10^9	+

相对检出限相关数据结果见表 6:

表 6 参考方法和替代方法 LOD 50 数据表

类别	LOD50/测试样品	置信下限 CFU/测试样品	置信上限 CFU/测试样品
UHT 灭菌乳和代乳饮料 采用 Soleris® 实时光电法	0.821	0.469	1.437
UHT 灭菌乳和代乳饮料 采用参考方法 (CAC/RCP 57-2004 附件 B 第 2.2 节)	0.567	0.328	0.980

经计算, Soleris® 实时光电法与参考方法的 RLOD=1.315, 小于 ISO 16140-2: 2016 对非配对实验设计的可接受限规定 2.5。

结论: Soleris® 方法和参考方法在检出水平上具备等效性。

3. 包容性研究

选取 50 株菌株, 在合适的培养基和温度下活化, 经过稀释使最终接种浓度在 1-5 CFU/L (具体菌量见表 7), 其中产芽孢微生物接种芽孢而非营养体。包容性研究实验数据见表 7:

表 7 菌株包容性研究数据

样品编号	菌种	菌株号	来源	每包装接种量 CFU	Soleris® NF-105 测试瓶报警时间 /h
1	土生克雷伯菌	17343	原奶	3.8	9.7
2	阴沟肠杆菌	1472	奶粉	4.1	6.8
3	产酸克雷伯氏菌	8387	水	4.2	6.8

4	抗坏血酸克吕沃 尔菌	17126	工业材料	2.3	9.5
5	不脱羧埃希氏菌	5501	脱脂奶粉	2.4	6.8
6	特氏克雷伯菌	NCIMB 8606	发酵奶油	2.1	6.8
7	成团泛菌	17030, NCIMB 702072	巴氏杀菌奶	4.2	6.8
8	嗜水气单胞菌	8388, NCTC 8049	一罐有鱼腥味的牛奶	4.3	10.9
9	大肠埃希氏菌	1476	奶粉	3.8	8.1
10	水拉恩氏菌	16911	饮用水	4.5	6.8
11	凝结芽孢杆菌	16586	豆类番茄酱	4.3	6.7
12	枯草芽孢杆菌	16597	蛋奶沙司	4.2	6.7
13	韦氏芽孢杆菌	16578	巴氏杀菌奶	3.7	6.8
14	多粘芽孢杆菌	16652	白葡萄酒酱冷鸡	4.6	6.7
15	蜡样芽孢杆菌	7746	奶油	4.8	6.7
16	假真菌样芽孢杆 菌	6317	土壤	4.1	6.7
17	短小芽孢杆菌	16594	白葡萄酒酱冷鸡	4.1	6.7
18	球形赖氨酸芽孢 杆菌	7757	未知	3.7	6.7
19	产气荚膜梭菌	15911, NCTC 8239	盐渍牛肉	4.7	6.7
20	地衣芽孢杆菌	16588	香蒜酱	3.8	31.1
21	浸麻类芽孢杆菌	16488	未知	1	33.8
22	短短芽孢杆菌	7748	未知	2	6.8
23	解硫胺素杆菌	7751	未知	2	23.3
24	饲料类芽孢杆菌	16605	大麦	3	6.8
25	土壤短芽孢杆菌	16606	未知	1	6.8
26	肉葡萄球菌	1123	羊奶	4.8	6.8
27	伊氏李斯特菌	16045, NCIMB 8510	奶酪	4.3	6.8
28	嗜热链球菌	7675	巴氏杀菌奶	4.1	6.7
29	嗜酸乳杆菌	3910	乳制品	3.2	17.9
30	广布肉毒杆菌	8999	布里干酪	2.3	6.8
31	腐生葡萄球菌	3503	蒸馏水	3	6.8
32	藤黄微球菌	1513	空气样本	2.1	9
33	粪肠球菌	272	奶粉	3.3	6.8
34	科氏葡萄球菌	409/3026	皮肤	4	6.8
35	金黄色葡萄球菌	314	奶酪	2.6	6.8
36	表皮葡萄球菌	16030	罐头封口胶	4.3	6.8
37	戊糖片球菌	1100	卤水	4.6	16.2
38	单核细胞增生李 斯特氏菌	3130	斯蒂尔顿干酪	3.6	6.8

39	英诺克李斯特氏菌	16828	奶酪工厂	2.9	6.8
40	人葡萄球菌	16029	未知	3.3	6.8
41	乳酸乳球菌	16659	生火腿	3.8	6.8
42	玫瑰色微球菌	7775	水	2.7	26.1
43	乳酸链球菌	1511	奶粉	4	6.8
44	病臭肠球菌	16860	豪达芝士	2.4	6.7
45	类鸟肠球菌	16852	牛乳	2.6	6.7
46	黑酵母菌	CRA16148	软饮生产工厂	2.2	6.8
47	纯黄丝衣霉	CRA16668; CBS113245	巴氏杀菌果汁	2.2	23.2
48	克鲁斯氏念珠菌	CRA629	酸奶	4.7	6.8
49	马克斯克鲁维酵母	CRA 6749	牛奶分离蛋白	3.3	6.8
50	德尔布有孢圆酵母	CRA16154	变质酸奶	3.3	16.4

如表 7 所示，所有低浓度加标微生物均可从样品基质中检出。

结论：Soleris®实时光电法具有极佳的包容性。

4. 联合实验室间研究

实验室间验证数据来自 7 个国家的 12 个实验室，验证实验室在当地采购 UHT 牛奶，并采用参考方法验证符合商业无菌要求。人工污染菌株为腐生性葡萄球菌 CRA 314，设计三个接种浓度， $L_0=0$ CFU/250 mL， $L_1=1.1$ CFU/250 mL， $L_2=4.3$ CFU/250 mL，每个菌体浓度是 96 个样品，每个参与验证实验室收到 24 个样品，即每个浓度、每种方法设计 8 个样品。因为只有低接种浓度水平出现部分阳性结果，因此只使用 L_1 浓度的结果进行分析，详见表 8：

表 8 L_1 浓度实验室间方法验证数据

结果	参考方法阳性	参考方法阴性
Soleris®实时光电法阳性	阳性一致 PA=21	阳性偏离 PD=19
Soleris®实时光电法阴性	阴性偏离 ND=21	阴性一致 NA=19

基于 ISO 16140-2 标准中非配对实验要求， L_1 浓度的 $(ND-PD)_{max}$ 可接受限值为 10.96，实际 $ND-PD=2$ ，因为 $(ND - PD)$ 最大值低于可接受值，因此满足 ISO 16140-2: 2016 要求。

整体结论：

Soleris®商业无菌测试瓶作为替代检测方法具有选择性和特异性。实验室间验证数据符合

ISO 16140-2: 2016 要求。综合专家实验室方法研究与联合实验室间研究数据, Soleris®实时光电方法 NF-105 测试瓶在商业无菌检测应用上与参考方法等效。

5. 国内实验室间验证数据

为了验证实时光电法用于低酸性罐藏食品和酸性罐藏食品商业无菌检测的可靠性和稳定性, 采用常温 UHT 纯牛奶、常温 UHT 香蕉牛奶饮料和 UHT 饮料各一个批次, 每个批次取 13 个样品作为测试样; 同时提供两种菌悬液, 分别为枯草芽孢杆菌(ATCC 6633)和嗜热脂肪地芽孢杆菌 (ATCC 7953), 作为阳性菌株添加实验; 样品和芽胞菌悬液均为冷链发样。

阳性菌株的添加实验要求进行不同浓度水平添加, 同时采用实时光电法和国家标准 GB 4789.26-2013 方法进行检测, 对比两种方法的结果。

5.1 加标培养物溶液制作

5.1.1 添加菌株工作菌悬液的制备

用无菌水将浓度为 10^6 CFU/mL 枯草芽孢杆菌和嗜热脂肪地芽孢杆菌菌悬液, 分别用无菌水进行梯度稀释到 10^2 CFU/mL, 取 1mL 悬液到无菌培养皿中, 倾注 15-20 mL, 于 $48\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温的 PCA 培养基或者其他计数培养基, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 进行菌落计数。该菌悬液标记为: 菌液 A, 取 3mL 菌液 A 加入 6 mL 无菌水, 得到菌体浓度约为 33 CFU/mL 的菌液, 记为菌液 B; 以此类推得到菌液 C, D, E。分别吸取 B、C、D 和 E 菌液 1mL 进行菌落计数。这样就得到已知菌体浓度的添加菌液。

5.1.2 接种测试瓶实验

选取乳制品 (3 种基质) 进行商业无菌测试, 共计 39 个样品。低水平添加处理, 采用 C、D、E 各 0.1 mL 进行添加, 每个添加水平做 2 个平行样本 (共计 36 个样品), 将阳性添加后的样品及对照样品 (添加水) 置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保温 $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 后, 进行 Soleris®测试和平板确认。

阳性添加方法: 用 75 %酒精对样品进行表面消毒, 使用无菌注射器吸取 0.1 mL C、D、E 菌悬液 无菌操作注射入样品中, 接种后用用无菌封口膜封口, 确保不泄露, 不溢液; 枯草芽孢杆菌和嗜热地芽孢杆菌分别进行接种。同时, 接种相同体积的无菌水作为阴性对照。

5.2 测试结果

表 9 添加实验结果

产品类 型	添加菌株种类	菌体添加 量 (CFU/m L)	GB 4789.26-201 3 国标方法 结果	实时光电法结果	两种方法结果一 致性

UHT 纯 牛奶	嗜热脂肪地芽孢杆菌	20	非商业无菌	非商业无菌	是
		4.6	非商业无菌	非商业无菌	是
		1.5	非商业无菌	非商业无菌	是
	枯草芽孢杆菌	8	非商业无菌	非商业无菌	是
		0.7	非商业无菌	非商业无菌	是
		0.2	非商业无菌	非商业无菌	是
无菌水	/	商业无菌	商业无菌	是	
常温 UHT 香 蕉牛奶 饮料	嗜热脂肪地芽孢杆菌	20	非商业无菌	非商业无菌	是
		4.6	非商业无菌	非商业无菌	是
		1.5	非商业无菌	非商业无菌	是
	枯草芽孢杆菌	8	非商业无菌	非商业无菌	是
		0.7	非商业无菌	非商业无菌	是
		0.2	非商业无菌	非商业无菌	是
无菌水	/	商业无菌	商业无菌	是	
UHT 饮 料	嗜热脂肪地芽孢杆菌	20	非商业无菌	非商业无菌	是
		4.6	非商业无菌	非商业无菌	是
		1.5	非商业无菌	非商业无菌	是
	枯草芽孢杆菌	8	非商业无菌	非商业无菌	是
		0.7	非商业无菌	非商业无菌	是
		0.2	非商业无菌	非商业无菌	是
无菌水	/	商业无菌	商业无菌	是	

5.3 试验结论

通过添加标准菌株实验很好的模拟了低污染水平的样品，采用的实时光电法与国标方法同时对添加阳性菌株的样品进行检测，结果一致性好。体现了实时光电方法的稳定性和可靠性。相比国标方法 10 天以上的检测周期，实时光电法仅耗时 72 h，显著提高了检测效率。

四、标准中涉及到的专利和知识产权的说明

Soleris®实时光电微生物快速检测系统、测试瓶NF-105为专利产品，受到美国专利保护。

五、产业化情况和推广应用论证

现行GB 4789.26-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验》规定测试保温时间10天。较长的测试周期给予企业较大的库存压力。缩短商业无菌检验周期，随之更快地完成仓库周转和产品放行，是国内乳制品企业的主要需求。实时光电法可在72 h内完成商业无菌检验，其阳性样品早期预警功能可以作为企业质量控制和及时采取必要纠偏措施的重要参考依据，从而大幅减少企业可能面临的财务压力或商誉损失。

国际上，Soleris®实时光电法已在包括美国、加拿大、欧盟、澳大利亚等广大发达国家中的乳制品行业广泛应用；印度、墨西哥等发展中国家亦有部分乳制品企业用户。Soleris®实时光电法在国内乳制品行业已进行了初步应用，显示 Soleris®与食品安全国家标准在商业无菌检验中具有等效性，且时间优势明显。

Soleris®实时光电法可有效提升乳制品生产企业商业无菌的检验效率，助力实现实验室检测数据的数字化和可溯源性，从而确保检测报告的真实性和完整性。该方法可为政府监管，乳制品相关标准、法规的制定提供技术参考，携手企业维护乳制品消费者“舌尖上的安全”，推动乳制品行业产品升级。

六、与国际、国外对比情况

本文件制定过程中未查到同类国际、国外标准。

七、与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准的协调性

本文件与现行相关法律、法规、规章及相关标准，特别是强制性标准完全保持一致。

八、重大意见分歧的处理经过和依据

标准制定过程中未发生重大分歧意见。

九、贯彻标准的要求和措施建议

建议本文件批准发布6个月后实施。

十、废止现行相关标准的建议

无

十一、其他应予说明的事项

无

《食品微生物学检验 商业无菌快速检测 实时光电法》标准起草工作组

2022年10月26日