

食品包材密封性微生物侵入检验方法研究

李俊楠, 毕春波, 张丹丹, 吴腾, 卢光辉, 马秀红, 马月莲, 卢光业

(内蒙古特康瑞营养食品有限责任公司, 呼和浩特 010000)

摘要: 食品用玻璃瓶是不可或缺的一部分, 市场中玻璃材质瓶体食品市场占有率很高。根据相关数据显示食品用的比例约为 20%左右。玻璃瓶装食品的无菌保证不仅取决于生产过程中过滤、终端灭菌等生产工序的控制, 包装材料的密封性也尤为重要。采用微生物侵入法对食品包装密封性中检验方法进行研究。本次实验应用《GB 4789.26-2023 食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验》^[1]和《GB 4789.2-2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[2]方法对玻璃瓶产品进行检验时, 只能产看检验结果, 不能清晰确定商业无菌或菌落总数检验后产品微生物不合格的具体原因。所以采用制作型式缺陷样品。采用激光打孔制备不同缺陷的低硼硅玻璃瓶做为型式缺陷样品, 并在包装中填充样品、污染铜绿假单胞菌样品、培养基的方式, 通过微生物菌落计数、无菌检查的方法确定玻璃瓶包装密封性情况, 并形成检验方法。

关键词: 微生物; 包材检验; 密封性; 商业无菌; GB 4789.26-2023; 玻璃材质

Abstract: Glass bottles for food are an indispensable part, and the market share of glass bottle bodies for food is very high. According to relevant data, the proportion of food used is about 20%. The sterility assurance of glass bottled food depends not only on the control of production processes such as filtration and terminal sterilization, but also on the sealing of packaging materials. Study on the inspection method of food packaging sealing using microbial invasion method. When using the methods of "GB 4789.26-2023 National Food Safety Standard Microbiological Examination of Food - Commercial Aseptic Inspection" and "GB 4789.2-2022 National Food Safety Standard Microbiological Examination of Food - Determination of Total Bacterial Count" to inspect glass bottle products in this experiment, only the inspection results can be observed, and the specific reasons for the product's microbiological failure after commercial aseptic or total bacterial count inspection cannot be clearly determined. So we adopt the production of defective samples. Low borosilicate glass bottles with different defects were prepared using laser drilling as type defect samples, and the packaging was filled with samples,

contaminated with *Pseudomonas aeruginosa* samples, and culture medium. The sealing condition of the glass bottle packaging was determined by microbial colony counting and sterile inspection, and an inspection method was developed.

Keywords: microorganisms; Packaging material inspection; Sealing performance; Commercial sterility; GB 4789.26-2023; Glass material

1 绪论

1.1 研究对象

玻璃瓶材质食品包装的密封性能和微生物污染程度,检测方法多用商业无菌或者菌落总数的检验方法进行测试。但随着食品种类的持续增多,一些不容易被人们发现的食物污染正悄然出现在市场中,由此引发了严重的食品安全问题,给人们的生命安全造成了严重威胁^[3]。出现密封不严、微生物不合格时,很难排查出具体根本原因。微生物污染包括细菌性污染、病毒和真菌及其毒素的污染。据世界卫生组织估计,在全世界每年数以亿计的食源性疾病患者中,70%是由于食用了各种致病性微生物污染的食品和饮水造成的。玻璃罐装的食物呈现配方多样化、成分复杂化,包材的密封不严直接导致产品微生物不合格。严格包装密封性能至关重要。对包材密封性进行重点监控检测,保障终端产品安全。本文旨在利用微生物侵入的方法对包材密封性能进行研究,对培养基、菌液、缺陷样品、正常产品进行分析验证,并得出有效结论。

1.2 立题依据

食品微生物检验是食品安全防控工作的重要环节。适宜的检验技术和规范的检验操作是有效控制食品质量和安全、保证食品卫生、为人们提供健康的食品供应的关键^[4]。微生物侵入法检测食品包材密封性能,适用于所有玻璃材质包装的食品。研究表明微生物检测技术能够检出食品中的致病微生物,分辨具体种类,应用价值良好^[5]。此种方法将样品中的内容物完全侵入到稀释后的菌液中,通过真空、正压力、常压测试,利用内容物中商业无菌和菌落总数检验的方法,实现包材密封性能的测试检验。在微生物侵入法在实际应用过程中表现出

灵敏、准确并且重复性好等多方面优点，且不受包材外观及形状的影响。经过验证微生物侵入法可作为各种包材密封性能测试的有效方法。

2 材料

2.1 仪器

稳定性试验箱（上海博迅医疗生物仪器股份有限公司）、培养室生化培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）、立式压力蒸汽灭菌器（上海博迅医疗生物仪器股份有限公司）、BL-220H 千分之一电子天平（日本岛津）、ZF-920 自动培养基分装器（上海昨非）、激光打孔机、压力真空表、温度计。

2.2 试剂、标准品、耗材

胰酪大豆胨液体培养基（GCP168A）、铜绿假单胞菌（CICC 24649）、水为 GB/T 6682-2008^[6]规定的一级水。

3 方法与结果

3.1 利用培养基模拟食品密封性检验

1) 培养基模拟物制作

胰酪大豆胨液体培养基作为非选择性培养基，适合铜绿假单胞菌（CICC 24649）生产，为菌落生长提供营养支持。准确称取胰酪大豆胨液体培养基 45g，加入 70℃以上的水 1.5L，搅拌使其溶解均匀，做好标识备用。培养基装入玻璃容器中，控制培养基液体经 0.45μm 过滤器过滤后进入分液器，利用分液器加入培养基，并充入氮气。整体进行 121℃灭菌 30min。取出全部灭菌产品进行外观完整性检查。

2) 培养基模拟物型式缺陷样品制作

模拟食品包装填充培养基后，制作缺陷样品。采用激光打孔机器对食品用玻璃瓶体打孔，设计了实验进行分析如表 1：

表 1 分析实验设计

Table 1 Analysis Experiment Design

玻璃瓶规格	漏孔位置	漏孔尺寸
500mL	瓶身	2μm
		5μm

3) 验证培养基可以作为模拟物实验

分别将玻璃瓶内装入培养基、型式缺陷样品于 20~25℃培养 7 天。为了达到极限条件再置于 30~35℃培养 7 天。后逐支进行商业无菌和菌落总数检验，结果均合格，符合 GB 4789.26-2023 食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验》的要求。说明培养基可以作为模拟物用于本次微生物侵入法在食品密封性中检验方法研究。检验结果如表 2:

表 2 检测结果

Table 2 Test Results

样品名称	样品	商业无菌检测结果	菌落总数检测结果
培养基模拟物制作	1	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	2	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	3	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	4	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	5	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	6	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
培养基模拟物 型式缺陷样品制作	7	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	8	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	9	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	10	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)

4) 培养基促菌生长能力检验

为了确定经过 14 天放置的培养基仍然具备菌株促生长能力，对检验后的培养基进行促菌生长能力检验。将培养基在无菌条件下倒入灭菌的 18×180mm 试管内，每个管内 12ml，其中两管各接入铜绿假单胞菌 100cfu，另外一管作为阴性对照，在 30~35℃下培养 7 天。后培养后的培养基进行菌落计数检查。结果均有大量菌落生长，同时对照样品无菌落生长。说明培养基放置仍然具备促生长能力。检验结果如表 3:

表 3 检测结果

Table 3 Test Results

样品名称	样品	接入铜绿假单胞菌数量	培养后菌落总数检测结果
培养基模拟物制作	1	100 CFU/mL	1.6×10^6 CFU/mL
	2	100 CFU/mL	2.9×10^6 CFU/mL
	3	100 CFU/mL	1.3×10^6 CFU/mL
	4	100 CFU/mL	9.1×10^6 CFU/mL
	5	100 CFU/mL	3.2×10^6 CFU/mL
	6	100 CFU/mL	1.2×10^8 CFU/mL
培养基模拟物 型式缺陷样品制作	7	100 CFU/mL	3.7×10^7 CFU/mL
	8	100 CFU/mL	1.9×10^8 CFU/mL
	9	100 CFU/mL	5.1×10^8 CFU/mL
	10	100 CFU/mL	7.2×10^5 CFU/mL

3.2 微生物侵入试验

1) 确定实验用铜绿假单胞菌的活力

为保证本次实验使用铜绿假单胞菌 (CICC 24649) 的冷冻甘油管的浓度 $> 10^8$ cfu/mL。取冷冻甘油管 1 支, 全部接种至 200ml 胰酪大豆胨液体培养基中, $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 培养 18~24h, 取培养后的铜绿假单胞菌 $10^{-7} \sim 10^{-9}$ 稀释液各 1ml, 用胰酪大豆胨琼脂培养基 15~20ml 注皿, 各平行测定两皿, $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 培养 48h, 在 24 小时与 48 小时分别计数。铜绿假单胞菌菌悬液计数, 结果菌液浓度均 $> 10^8$ cfu/mL。说明铜绿假单胞菌活力正常可用于微生物侵入实验。

2) 微生物侵入实验

将铜绿假单胞菌培养物加入装有适宜胰酪大豆胨液体培养基的不锈钢密封槽 (200mL 培养物加入 16L 胰酪大豆胨液体培养基中), 搅拌均匀, 作为微生物侵入试验用菌悬液。将试验用菌悬液置于 10L 密封不锈钢罐中作为侵入实验装置。取培养基模拟物样品和培养基模拟物型式缺陷样品各 15 瓶, 同时放入到 10L 密封不锈钢罐中, 使样品全浸泡于菌悬液中, 确保瓶体部分与菌悬液充分接触后。分别模拟真空、高压、常压的放置条件对样品进行侵入实验。其中负压真空值 -0.025MPa 保持 3 小时; 正压 0.025MPa 保持 3 小时; 常压浸泡 3 小时。

从不锈钢罐中取出浸泡菌悬液后样品。先置装有 0.2% 新洁尔灭的不锈钢密封槽中浸泡 10 分钟, 然后取出浸泡于另外一装有新洁尔灭的容器中, 浸泡 10 分钟后, 再用杀孢子消毒

液消毒玻璃瓶表面，最后用纯化水冲洗，擦干瓶外残余液体备用。分别单独装入低密度聚乙烯袋中密封。置于 30~35℃下培养 7 天，逐日观察瓶内培养基中微生物生长情况并做好记录。逐日观察并记录生长情况。结果其中正常培养基模拟物样品在三种条件下均符合商业无菌要求，没有菌落生长；培养基模拟物型式缺陷样品在三种条件下均不符合商业无菌要求，有大量菌落生长。说明在此工艺条件和灌装密封过程能够保证玻璃瓶体密封。检验结果如表 4:

表 4 检测结果

Table 4 Test Results

样品名称	样	测试条件	商业无菌检测结果	菌落总数检测结果
培养基模拟物制作	1		符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	2	负压真空值	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	3	-0.025MPa	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	4	保持 3 小时	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	5		符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	6		符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	7	正压	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	8	0.025MPa	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	9	保持 3 小时	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	10		符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	11		符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	12	常压浸泡 3	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	13	小时	符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	14		符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
	15		符合商业无菌	未检出 (<10 CFU)
培养基模拟物型式缺陷样品制作	1		不符合商业无菌	1.3×10^9 CFU/mL
	2	负压真空值	不符合商业无菌	2.9×10^6 CFU/mL
	3	-0.025MPa	不符合商业无菌	3.8×10^3 CFU/mL
	4	保持 3 小时	不符合商业无菌	5.5×10^6 CFU/mL
	5		不符合商业无菌	1.8×10^9 CFU/mL

6		不符合商业无菌	1.5×10^5 CFU/mL
7	正压	不符合商业无菌	1.6×10^6 CFU/mL
8	0.025MPa	不符合商业无菌	1.1×10^6 CFU/mL
9	保持 3 小时	不符合商业无菌	7.2×10^4 CFU/mL
10		不符合商业无菌	6.3×10^6 CFU/mL
11		不符合商业无菌	5.1×10^6 CFU/mL
12	常压浸泡 3 小时	不符合商业无菌	2.8×10^6 CFU/mL
13		不符合商业无菌	4.3×10^6 CFU/mL
14		不符合商业无菌	6.9×10^6 CFU/mL
15		不符合商业无菌	3.6×10^5 CFU/mL

4 讨论

《GB 4789.26-2023 食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验》和《GB 4789.2-2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》方法对产品进行检验时只能作为最终结果的判定检验依据，不能作为生产过程微生物异常原因的排查检验方法。利用培养基加入菌液后，在常规和非常规条件下对包材的密封性能进行检验，最终得到有效测试方法。其中为确保在实验过程中菌液具备良好的促生长能力，对模拟实验后的菌液活力、数量进行确认测试。结果表明该方法能够用于包材密封性能测试，可以作为实验室日常检验玻璃瓶包材密封性能的方法。

综上所述，在培养基中加入菌液，将整个玻璃瓶包材侵入菌液内，能够快速排查出异常产品微生物不合格的原因。整个测试方法简单易行，结果准确。本文可作为后续日常监测玻璃品密封性能的实验室方法提供一定的参考。

参考文献:

- [1]GB 4789.26-2023 食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验[S].
- [2]GB 4789.2-2022 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S].
- [3]闫香君, 食品工程中化学污染的控制策略[J]医药卫生科技;工程科技I辑, 2022.28.007,

<https://tr.oversea.cnki.net/>.

[4]王婷婷, 浅析食品微生物检验技术研究进展及质量控制[J]《食品安全导刊》2021年第24期 43-43,47, <https://www.xueshushe.cn/shi-pin-an-quan-dao-kan>.

[5]张丽, 范鹏飞, 微生物检测技术在食品检验中的检测结果分析实验室检测[J].2024年5月, 第2卷 第5期.<http://www.chinatreeqk.com/>.

[6] GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法[S].

中国仪器仪表教学网