

# 《食品用菌种检验 鼠李糖乳酪杆菌检验 PMA-qPCR 法 (征求意见稿)》编制说明

## 一、工作简况

### (一) 背景

对食品用菌种开展精准鉴定和活菌定量,是保障产品质量和实现生产过程一致性控制的重要手段,也是市场监管相关产品保质期内活菌数是否符合要求的重要依据。目前,国内外现行标准中尚无针对特定食品用菌种的活菌定量检测方法,建立有关技术标准已成为行业亟待解决的关键共性问题。鼠李糖乳酪杆菌作为目前研究和应用最为广泛的乳酸菌之一,是我国《可用于食品的菌种名单》、欧盟 QPS 名单和美国 GRAS 名单收录菌种,具有长期安全使用历史,但目前尚无针对食品用鼠李糖乳酪杆菌的活菌定量检测标准方法。

叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)与荧光定量 PCR 耦合技术(PMA-qPCR)可有效区分活、死细胞并实现复杂背景中单一菌种的特异性定量检测,被广泛应用于食品中乳酸菌的活菌定量研究。本项目通过系统方法学验证,建立了鼠李糖乳酪杆菌的 PMA-qPCR 检测标准方法,可同时实现食品中鼠李糖乳酪杆菌的精准鉴定和活菌计数,为满足食品用菌种检测需求、提高监管效能、保障消费者权益提供技术支撑。

### (二) 主要起草过程

项目任务来自《中国食品科学技术学会关于发布 2022 年团体标准立项计划(第三批)的通知》(中食学字(2022)第 031 号),项目编号为 ttbz-2022-006。2022 年 10 月,起草组在充分整理研究数据、收集国内外相关法律法规的基础上,制定了详细的工作计划。2022 年 11 月至 2023 年 3 月,组织开展了方法建立、方法验证研究,形成团体标准初稿。2023 年 3 月,组织召开专家研讨会,与会专家一致认为标准建立和方法验证过程设计合理、数据详实、科学可行,可满足食品用鼠李糖乳酪杆菌活菌定量检测要求,建议完善实验室间比对、方法适用性等验证数据,进一步规范标准文本、完善技术参数。2023 年 4 月至 2023 年 8 月,组织开展三家实验室的方法验证比对、方法适用性研究,根据专家意见,完善形成标准征求意见稿。

## 二、国内外相关法规标准情况

在我国,已发布的《益生菌类保健食品申报与审评规定(试行)》、《食品安全国家标准 预包装食品标签通则》(GB 7718-2011)、《食品安全国家标准 饮料》(GB 7101-2022)、《食品

加工用乳酸菌》(QB/T 4575-2013)、《食品用益生菌通则》(T/CIFST 009-2022), 以及正在制修订的《食品安全国家标准 食品加工用菌种制剂(征求意见稿)》、《食品用菌种安全性评价程序(征求意见稿)》等均对食品用菌种的鉴定、活菌总数提出了明确要求, 活菌计数推荐方法均为平板计数法。

国际上, WHO/FAO《食品益生菌评价指南》和 IDF《No.513/2021 益生菌菌株水平鉴定指导文件》推荐采用 PFGE、RAPD、WGS、特异性 PCR 等技术对益生菌进行鉴定。美国《食品化学法典 FCC12》推荐采用特异性 PCR 引物对食品用菌种开展鉴定。ISO 7889、ISO 29981 等系列标准均推荐采用平板计数法对食品中乳酸菌进行活菌计数。但目前国际上对 PMA-qPCR 技术在食品用菌种的活菌定量检测方面尚无相关标准发布。

### 三、标准主要技术内容

#### (一) 方法建立

通过文献检索和实验验证, 筛选确认了具有鼠李糖乳酪杆菌靶向特异性的 qPCR 引物; 采用珠式样品研磨器对菌株进行 DNA 提取, 条件设置为: 破碎速度 6 m/s, 破碎时间 12 s; PMA 作用条件设置为终浓度 50  $\mu\text{mol/L}$ , 暗孵育时间 5 min, 曝光时间 15 min, 该条件对鼠李糖乳酪杆菌活菌 DNA 的 qPCR 扩增无显著性影响 ( $P > 0.05$ ), 且对死菌 DNA 的 qPCR 扩增的抑制率达到 99.76%以上; 建立基于 CFU 的 qPCR-DNA 标准曲线, 标准曲线的扩增效率在 90%–110%之间, 且  $R^2 > 0.99$ , 熔解曲线为单一峰, 满足 qPCR 要求。

#### (二) 方法验证

##### 1. 实验室内验证

实验室内验证主要参考《ISO 16140 食物链微生物学—方法验证》、《中国药典(2020 版)》等国内外方法验证指南开展。

**(1) 包容性和排他性:** 将特异性引物进行基因组数据验证和 PCR 实验验证。结果显示, 引物对  $> 50$  株鼠李糖乳酪杆菌可实现阳性检出, 对  $> 400$  株属内种间、科内属间的非鼠李糖乳酪杆菌均为阴性检出, 表明引物特异性良好。

**(2) 相对正确度:** 配置鼠李糖乳酪杆菌纯菌液样品、混合菌悬液样品和菌粉原料样品, 进行相对正确度验证。测定值与理论值一致性较好, 表明该方法对不同类型样品中鼠李糖乳酪杆菌活菌计数具有良好的相对正确度。

**(3) 准确度:** 配制含不同浓度的混合菌液, 其中鼠李糖乳酪杆菌含量为  $10^3$ – $10^8$  CFU/mL, 并进行 10 次生物学重复。测定值和理论值的偏差符合可接受限值, 证明该方法对不同浓度水平的鼠李糖乳酪杆菌检测具有较好的准确度。10 次重复间的相对标准偏差  $RSD < 35\%$ ,

表明该方法具有良好的稳定性。

**(4) 定量限:** 配制含不同浓度的混合菌液, 其中鼠李糖乳酪杆菌含量为  $10^2$  -  $10^4$  CFU/mL, 使用本方法对样品进行检测, 结果显示当样品浓度  $> 1 \times 10^3$  CFU/mL 时, 样品中的鼠李糖乳酪杆菌可被准确定量检出。

**(5) 线性:** 当鼠李糖乳酪杆菌活菌浓度在  $10^3$  -  $10^8$  CFU/mL 范围内时, 该方法拟合曲线的  $R^2 = 0.996$ , 相关系数  $r > 0.95$ , 线性拟合关系较好。

**(6) 范围:** 综合准确度、定量限、线性结果, 所建立的 PMA-qPCR 方法检测范围为  $10^3$  -  $10^8$  CFU/mL。

**(7) 耐用性:** 选择不同品牌及不同批次的 qPCR 混合试剂, 对同一样品进行检测, 结果显示测定值与理论值一致性较好, 所建方法具有良好的耐用性。

## 2. 实验室间验证

实验室间验证主要参考《ISO 16140 食物链微生物学—方法验证》开展。制备含有鼠李糖乳酪杆菌和其他乳酸菌的混合菌粉原料, 由中国食品药品检定研究院、山西大学、中国工业微生物菌种保藏管理中心分别开展实验。各实验室检测的鼠李糖乳酪杆菌活菌数量与样品添加量一致性较高, 偏差符合可接受限值, 证明该方法在不同实验室间的检测结果具有较好的准确度和稳定性。

### (三) 方法适用性研究

收集市面常见的含鼠李糖乳酪杆菌的单一菌种原料、复合菌种原料和复合益生菌固体饮料, 采用本标准方法开展适用性评价。结果表明, 所检产品的鼠李糖乳酪杆菌活菌数与产品声称添加量一致性较高, 所建方法具有较好的准确性和稳定性, 适用于原料及复合益生菌固体饮料中鼠李糖乳酪杆菌活菌数的测定。

## 四、其他需要说明的事项

无。