

《食品用菌种检验 副干酪乳酪杆菌检验 PMA-qPCR 法 (征求意见稿)》编制说明

一、工作简况

(一) 背景

食品用菌种是我国食品工业发展的重要战略性生物资源，在各类食品中被广泛应用。针对单一和复合菌种产品，开展菌种精准鉴定和活菌定量检测，是保障产品质量和实现生产过程一致性控制的重要技术手段。2024 年 4 月，中国食品科学技术学会正式发布《食品用菌种检验 鼠李糖乳酪杆菌检验 PMA-qPCR 法》团体标准，于 2024 年 4 月 1 日正式实施。该标准为首个将 PMA-qPCR 技术应用于食品用菌种活菌定量检测的标准方法，为益生菌活菌靶向定量检测标准提供了技术参考。为进一步拓展 PMA-qPCR 方法的行业应用，本项目持续深入研究该技术在其他食品用菌种的鉴定和活菌定量方面的可行性。

副干酪乳酪杆菌 (*Lacticaseibacillus paracasei*) 作为目前研究和应用最为广泛的乳杆菌之一，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。本标准以副干酪乳酪杆菌为研究对象，通过系统方法学验证，建立了副干酪乳酪杆菌的 PMA-qPCR 检测标准方法，可同时实现食品中副干酪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 2024 年团体标准立项计划（第一批）的通知》（中食学字〔2024〕第 001 号），项目编号为 ttbz-2024-001。2023 年 7 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。2023 年 11 月至 2024 年 5 月，组织开展了方法建立、方法验证研究，形成团体标准初稿。2024 年 6 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，可满足食品用副干酪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。2024 年 6 月至 2024 年 9 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）》、GB 7718-2011《食品安全国家标准 预包装食品标签通则》、GB 7101-2022《食品安全国家标准 饮料》、GB 31639-2023《食品安全国家标准 食品加工用菌种制剂》、QB/T 4575-2013《食品加工用乳酸菌》、T/CIFST 009-2022《食品用益生菌通则》，以及正在制修订的《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。2024年4月，中国食品科技学会发布 T/CIFST 020-2024《食品用菌种检验 鼠李糖乳酪杆菌检验 PMA-qPCR 法》团体标准，首次将 PMA-qPCR 技术应用于食品用菌种活菌定量检测标准方法，但目前未见适用于副干酪乳酪杆菌的 PMA-qPCR 检测方法。

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|IDF 117:2003《酸奶中特征微生物的计数 37℃菌落计数法》、ISO 29981|IDF 220:2010《乳制品 双歧杆菌的计数 37℃条件下的菌落计数法》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，目前国际上未见 PMA-qPCR 技术应用在食品用菌种的活菌定量检测方面的相关标准发布。

三、标准主要技术内容

（一）方法建立

构建副干酪乳酪杆菌全基因组数据库，开展泛基因组分析，挖掘副干酪乳酪杆菌种水平特异性引物；采用珠式样品研磨仪对菌株进行 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，该条件对副干酪乳酪杆菌活菌 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 99.96%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 $R^2>0.98$ ，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 16140-2:2016《食物链微生物学—方法验证—第2部分:针对参考方法的替代(专有)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 > 63 株副干酪乳酪杆菌可实现阳性检出,对 > 460 株属内种间、科内属间的非副干酪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: 配制副干酪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,表明该方法对不同样品中副干酪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,其中副干酪乳酪杆菌含量为 10^3 - 10^8 CFU/mL,并进行5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副干酪乳酪杆菌检测具有较好的准确度。5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) 定量检测限: 配制含不同浓度的混合菌液,其中副干酪乳酪杆菌含量为 10^3 - 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 $> 7.30 \times 10^3$ CFU/mL时,样品中的副干酪乳酪杆菌可被准确定量检出。

(5) 线性: 当副干酪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 $R^2 = 0.994$,相关系数 $r \geq 0.95$,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 7.30×10^3 - 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。

(8) 不确定度: 当副干酪乳酪杆菌活菌浓度在 10^3 - 10^8 CFU/mL范围内时,利用5次重复性测量数据计算相对扩展不确定度,结果表明各浓度梯度的不确定度在可接受范围内,所建方法具有良好的稳定性。

2. 实验室间验证

实验室间验证主要参考 ISO 16140-2:2016《食物链微生物学—方法验证—第2部分:针对参考方法的替代(专有)方法验证》开展。制备含有副干酪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、中国检验检疫科学

研究院、北京市疾病预防控制中心分别开展实验。依据 ISO 16140-2:2016 对实验室间比对数据进行统计学方法分析，各实验室检测的副干酪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

制备 25 株不同副干酪乳酪杆菌纯菌液、收集市面常见的 10 种含副干酪乳酪杆菌的单一菌种原料、复合菌种原料和 16 种复合益生菌固体饮料，采用本标准方法开展适用性评价工作。参考 ISO 16140-3:2021 对实验结果进行分析，结果表明，所检产品的副干酪乳酪杆菌活菌数与产品声称添加量一致性较高，具有较好的准确性和稳定性；对于无标签标识的产品，所建方法能够成功检出产品中副干酪乳酪杆菌活菌含量，且能够有效鉴别是否存在活性副干酪乳酪杆菌。PMA-qPCR 方法特异性强、准确度高，适用于原料及复合益生菌固体饮料中副干酪乳酪杆菌活菌数的测定。

四、其他需要说明的事项

无。