

《食品用乳酸菌鉴定技术指南》行业标准征求意见稿

编制说明

一、工作简况

1. 任务来源

根据《关于印发 2012 年第二批行业标准制修订计划的通知》(工信厅科〔2012〕119 号),《食品用乳酸菌鉴定技术指南》(计划号:2012-1196T-QB)列入轻工行业标准计划。本标准由全国食品发酵标准化中心归口,中国食品发酵工业研究院、上海交大昂立股份有限公司等单位负责起草。

2. 目的和意义

乳酸菌是一类可发酵糖主要产生大量乳酸的细菌的通称,是益生菌中最具代表性的菌属,益生乳酸菌能够促进机体内菌群平衡或者预防生态失调、缓解乳糖不耐症等作用。据统计,目前的全球乳酸菌市场规模已经超过 288 亿美元,并以每年 20%的速度增长,我国以酸奶及乳酸菌饮料为主要发展领域,产业规模超过 200 亿元。

根据联合国粮农组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 和世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 2002 年发布的《食品中益生菌评价指南》(Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food), 指南认为菌种鉴定对确定菌种特定的健康功能和流行病学监测与研究具有重要意义,我国已经制定了 QB/T 4575-2013 《食品加工用乳酸菌》行业标准,统一规范了乳酸菌发酵剂制剂质量要求,但对于乳酸菌菌种鉴定方面则没有具体要求。

我国对乳酸菌菌种采取名单制管理,自 2005 年以来,陆续发布了《可用于保健食品的益生菌菌种名单》、《可用于食品的菌种名单》、

《可用于婴幼儿食品的菌种名单的公告》，主要包括双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）和链球菌属（*Streptococcus*）等三个属，但目前我国尚未制定乳酸菌鉴定标准，本标准根据国际相关组织公布的技术文件中乳酸菌鉴定的指导原则，建立可用于食品的双歧杆菌属、乳杆菌属和链球菌属等乳酸菌菌种鉴定一般原则和程序，进一步完善我国乳酸菌技术标准体系。

3. 简要编制过程

起草工作组积极筹备标准制定的前期工作，开展多项基础研究工作。计划下达后，为了使本标准更具有先进性、科学性，起草工作组查阅了大量国内外文献资料及相关技术法规，通过分析，确定了标准的适用鉴定范围，按照国际相关组织公布的技术文件中乳酸菌鉴定的指导原则，初步建立可用于食品的双歧杆菌属、乳杆菌属和链球菌属等乳酸菌菌种鉴定一般原则和程序。

起草工作组采取鉴定方案是利用分子生物学和生理生化方法结合，重点是采用分子生物学方法，完成 API、16s 全长及部分序列分析，部分菌种还进行了看家基因分析，所建立的鉴定方法基本能够将常见乳酸菌鉴定至种水平，并在起草工作组内进行方法学验证，在此基础上，形成标准征求意见稿。

二、标准编制原则

以科学技术和实验数据为基本依据，结合产品实际生产情况，经过科学研究而制定。本标准的制定充分考虑规范行业发展，促进乳酸菌行业技术进步，充分考虑国内相关的法规要求，结合国情和产品特点；与相关标准法规协调一致；结合行业国内的实际情况，确保标准的科学性、先进性、可操作性。

三、主要技术内容情况

1. 范围

本标准适用于可用于食品的双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 等乳酸菌的种水平鉴定。

具体菌种名单如下:

	名称	拉丁学名
一	双歧杆菌属	<i>Bifidobacterium</i>
1	青春双歧杆菌	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
2	动物双歧杆菌 (乳双歧杆菌)	<i>Bifidobacterium animalis</i> (<i>Bifidobacterium lactis</i>)
3	两歧双歧杆菌	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
4	短双歧杆菌	<i>Bifidobacterium breve</i>
5	婴儿双歧杆菌	<i>Bifidobacterium infantis</i>
6	长双歧杆菌	<i>Bifidobacterium longum</i>
二	乳杆菌属	<i>Lactobacillus</i>
1	嗜酸乳杆菌	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
2	干酪乳杆菌	<i>Lactobacillus casei</i>
3	卷曲乳杆菌	<i>Lactobacillus crispatus</i>
4	德氏乳杆菌保加利亚亚种 (保加利亚乳杆菌)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> (<i>Lactobacillus</i> <i>bulgaricus</i>)
5	德氏乳杆菌乳亚种	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
6	发酵乳杆菌	<i>Lactobacillus fermentum</i>
7	格氏乳杆菌	<i>Lactobacillus gasseri</i>
8	瑞士乳杆菌	<i>Lactobacillus helveticus</i>
9	约氏乳杆菌	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
10	副干酪乳杆菌	<i>Lactobacillus paracasei</i>

11	植物乳杆菌	<i>Lactobacillus plantarum</i>
12	罗伊氏乳杆菌	<i>Lactobacillus reuteri</i>
13	鼠李糖乳杆菌	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
14	唾液乳杆菌	<i>Lactobacillus salivarius</i>
三	链球菌属	<i>Streptococcus</i>
1	嗜热链球菌	<i>Streptococcus thermophilus</i>

2.主要技术条款说明

1、本标准通过参考联合国粮农组织（Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO）和世界卫生组织（World Health Organization, WHO）分别于2001和2002年发布的《含活性乳酸菌食品（含乳粉）中益生菌的健康和营养特性》和《食品中益生菌评价指南》（Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food）以及国际乳品协会2012年发布455号公告《发酵食品中微生物菌种安全性论证》等文件，根据上述文件中涉及乳酸菌鉴定方面技术内容，建立可用于食品的双歧杆菌属、乳杆菌属和链球菌属等乳酸菌菌种鉴定一般原则和程序。

主要技术思路如下：在获得乳酸菌菌种纯培养后，采用表型试验和聚合酶链式反应相结合的方式鉴定，首先通过提取乳酸菌基因组DNA，利用通用引物扩增16s rRNA，将所得的PCR产物进行测序，并将DNA序列与国际已有核酸序列数据库（如Genbank、EMBL、DDBJ等）中已知参考序列进行同源性搜索比对，根据鉴定菌种的种/属信息，利用乳酸菌不同属特异性引物或其他用于种或属水平鉴定的基因引物扩增目标DNA片段，将所得的PCR产物测序后进行序列比对，并根据形态和生理生化验证和确定。生理生化鉴定方法和PCR鉴定方法也可同时进行。生理生化鉴定方法可依据相关食品安全国家标准进行。

2、引物设计

依据不同的鉴定目的，可选择不同的目的基因，用于属、种水平鉴别基因有 16s rRNA 等，用于种、亚种水平的鉴别基因有 16s~23s rRNA 转录间区序列、苯丙氨酰-tRNA 合成酶 α 亚基 (phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit, *pheS*)、RNA 聚合酶 α 亚基 (RNA polymerase alpha subunit, *rpoA*)、翻译延伸因子 Tu (translational elongation factor, *tuf*) 等。本标准中主要针对乳杆菌属的 *pheS* 基因进行分析。

3、附录 A

附录 A 给出了双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 等乳酸菌的 PCR 鉴定方法，针对不同属，给出不同的鉴定方案，乳杆菌属分别选择 16sRNA (全长)、16sRNA (部分, 属特异性) 和看家基因 *pheS* 作为目的基因进行鉴定。双歧杆菌属选择 6sRNA (全长)、16sRNA (部分, 属特异性)，嗜热链球菌属选择 16sRNA (部分)。

三、主要试验 (或验证) 情况分析

标准中主要验证了分子生物学技术在乳酸菌种水平鉴定结果，根据双歧杆菌属、乳杆菌属和嗜热链球菌标准菌株 16sRNA 全长序列构建的系统发育树，首先利用 16sRNA 全长序列的测定，能够将三个属的乳酸菌至少鉴定至属水平，部分通过序列比对可鉴定至种水平，在实验验证部分，也证实了这一点。因此在对乳酸菌三个属进行鉴定时，首先测定 16sRNA 全长序列，能够快速了解乳酸菌大致种属信息，有助于后续鉴定方案的深入和选择。

在了解乳酸菌大致种属信息后，根据序列比对信息，对于尚不能鉴定至种水平的菌株 (乳杆菌属和双歧杆菌属)，分别采用属特异

性引物扩增目的基因，提高鉴定分辨率，在进行分析测试后发现，仍有部分近源种如干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌尚不能很好的区分，*pheS* 基因在干酪乳杆菌群中表现出较大的基因差异性，大多数情况下差异达到 10%，种内差异达到 2%，因此再利用 *pheS* 基因对乳杆菌部分近源种进行序列分析，能够进一步鉴定至种水平。

四、标准中涉及的专利

无。

五、产业化情况、推广应用论证和预期达到的经济效果等情况

标准的实施将有效促进乳酸菌行业有序发展，维护生产者、经营者和消费者的合法权益。

六、采用国际标准和国外先进标准情况，与国际、国外同类标准水平的对比情况，国内外关键指标对比分析与测试的国外样品、样机的相关数据对比情况。

联合国粮农组织（Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO）和世界卫生组织（World Health Organization, WHO）2002 年发布了《食品中益生菌评价指南》(Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food)，指南中认为确定益生菌的种和属很有必要，菌种鉴定对确定菌种特定的健康功能和流行病学监测与研究具有重要意义，DNA-DNA 杂交是确定菌株种属的参考方法，但该方法需要保藏大量参考菌株，许多实验室不具备这样的条件，因此建议用 DNA 序列编码 16s rRNA 的方法代替杂交试验，并建议综合运用基因分型试验和表型试验。

国际乳品协会（International Dairy Federation, IDF）2012 年发布 455 号公告《发酵食品中微生物菌种安全性论证》(Safty Demonstration of Microbial Food Culture (MFC) in Fermented Food Products)，公布了

食品用微生物菌种,其中包括细菌 195 种,在确定细菌分类学地位时,建议采用多相鉴定的方法,即当菌株和模式菌种在表型和/或基因型具有高度的相似性时,被归为同一种。

本标准在制定过程中参考和借鉴了国际相关文件的乳酸菌鉴定的指导原则,初步建立可用于食品的双歧杆菌属、乳杆菌属和链球菌属等乳酸菌菌种鉴定一般原则和程序。

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

本标准从我国乳酸菌行业的实际情况出发,参考了国内外相关资料,体现了科学性、先进性和可操作性原则,在制定过程中充分考虑国内相关的法规要求,结合国情和产品特点;与相关标准法规包括强制性标准协调一致。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

九、标准性质的建议说明

建议为推荐性行业标准发布实施。

十、贯彻标准的要求和措施建议

在本标准通过审核、批准发布之后,由相关部门组织力量对本标准进行宣贯,在行业内进行推广。建议本标准尽快发布实施。

十一、废止现行相关标准的建议

无。

十二、其它应予说明的事项

无。

全国食品发酵标准化中心

2015 年 09 月