

中国营养保健食品协会团体标准



T/CNHFA 437—2024

## 后生元（乳酸菌类）灭活菌数检验

Determination of Postbiotic Inactivated Lactic Acid Bacteria Count

2024-12-23 发布

2025-01-01 实施

中国营养保健食品协会

发布

## 前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

有关专利的说明（参考 GB/T 1.1-2020 附录 D）

本文件由中国食品药品检定研究院提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、艾地盟（上海）管理有限公司、诺维信一康生物科技（上海）有限公司、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、拉曼生物科技（北京）有限公司、安利（中国）日用品有限公司、汤臣倍健股份有限公司、雀巢（中国）有限公司、ABiotics S.A.、帝斯曼维生素贸易（上海）有限公司、意大利 Sacco System、渤海大学、完美（广东）日用品有限公司、江西仁仁健康微生态科技有限公司、深圳保时健生物工程有限公司、景岳生物科技股份有限公司、华大精准营养（深圳）科技有限公司、安琪酵母股份有限公司、健合（中国）有限公司、微康益生菌（苏州）股份有限公司、天津创源生物技术有限公司。

本文件主要起草人：崔生辉、刘娜、王亚萍、李景云、俞海琦、刘虹、杨静、程翔、罗蓉、连晓雷、王薇、律冉、毛雪丹、乐晓洁、刘贺、张艳霞、余萍、张思璐、蔡宛桦、张海峰、陈智仙、乔小青、方曙光、梁武、刁永朝、马海然、张铮铮、余日晖、赵溪、薛永霞、王瑶、周大宇、苏美玲、钟一祎、黄亚群、曾丹华、夏九学、王海宽。

# 后生元（乳酸菌类）灭活菌数检验

## 1 范围

本标准规定了后生元（乳酸菌类）灭活菌数检验方法。

本标准第一法适用于后生元（乳酸菌类）纯菌粉或纯菌液原料灭活菌数的测定，第二法适用于后生元（动物双歧杆菌乳亚种类）以及添加了后生元（动物双歧杆菌乳亚种类）的食品中灭活菌数测定。

## 2 术语和定义

### 2.1 后生元（乳酸菌类） postbiotics (lactic acid bacteria category)

一类对人体起到健康有益作用的灭活乳酸菌。

### 2.2 灭活菌数 inactivated bacteria cells count

经灭活处理的乳酸菌细胞数。

### 2.3 单拷贝基因 single-copy genes

在细菌基因组中有且仅有一个拷贝数的基因。

## 第一法（非特异性方法） 细菌计数板方法

## 3 原理

将经过适当稀释的灭活菌悬液置于细菌计数板计数室与盖玻片之间，用显微镜计数每个计数格中的细菌颗粒，根据计数格体积和稀释倍数计算单位体积菌悬液中的细菌总数。此方法计数样品中所有细菌数量，不区分不同种属菌体，也不区分菌体是否灭活。

## 4 试剂和材料

### 4.1 试剂

无菌蒸馏水。

### 4.2 设备和材料

4.2.1 显微镜（400倍）。

4.2.2 电子天平：感量0.001 g、0.0001 g。

4.2.3 细菌计数板及特定盖玻片（或其他适用计数板）。

4.2.4 微量移液器及吸头。

4.2.5 1.5 mL离心管。

4.2.6 涡旋混合器。

## 5 实验方法

5.1 取适量无菌蒸馏水，缓慢滴加到洁净的细菌计数板上，将计数板置于显微镜载物台上，在10倍物镜下观察，验证显微镜视野的清晰度和细菌计数板的洁净度。

5.2 用电子天平精密称取适量样品，用无菌蒸馏水溶解混匀，制成悬浮液，并稀释至适宜浓度后置于1.5 mL离心管中；

5.3 取混匀的适宜浓度菌悬液，缓慢滴加到细菌计数板上，盖上盖玻片，将计数板置于显微镜载物台上，静置2~3 min，待细菌沉降稳定；

5.4 在10倍物镜下观察，找到合适视野后，在40倍物镜下计数计数格中细菌数，平行测定3次，计算平均值；

5.5 用无菌蒸馏水冲洗细菌计数板，待干燥后回收再用。

## 6 计数原则与方法

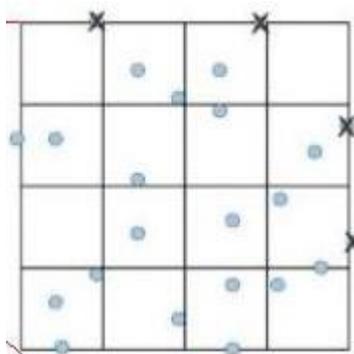


图1 细菌计数板计数原则示意图

### 6.1 计数原则

6.1.1 计下不计上，计左不计右（参考图1）；

6.1.2 镜下偶见由两个或两个以上细菌组成的细菌团，应按单个菌计算；

6.1.3 若细菌团数量超过10%，需重新制备菌悬液。

### 6.2 计数方法

以小格规格为 0.05 mm×0.05 mm、深度为 0.02 mm 的细菌计数板为例：小格面积=0.05 mm×0.05 mm，每个中格由 16 个小格组成，盖玻片与载玻片之间液体高度为 0.02 mm，中格体积=0.05 mm×0.05 mm×16×0.02 mm=8×10<sup>-4</sup> mm<sup>3</sup>，即 8×10<sup>-7</sup> mL，计数适宜浓度为 10~100 细菌/中格。

计数公式：细菌数（个/mL）=（中格细菌数×稀释倍数）/（8×10<sup>-7</sup>）

其他规格细菌计数板计算方法参考使用说明书。

## 7 结果与报告

3次平行计数结果偏差应≤20%，计算平均值；

根据计数结果出具报告，以“个/g（mL）”表示。

## 8 注意事项

8.1 每一步稀释和制片前，需将样品液充分混合均匀，建议在混合器上至少震荡30 s；

8.2 制片时若产生气泡，则需重新制片。

## 第二法（特异性方法）灭活动物双歧杆菌乳亚种荧光定量 PCR 检测方法

### 9 原理

采用荧光定量PCR技术，以动物双歧杆菌乳亚种基因组中的单拷贝基因*atp-D*为靶标进行扩增。通过构建标准曲线，定量样品中*atp-D*基因的拷贝数，进而计算样品中灭活的动物双歧杆菌乳亚种数量。

### 10 试剂和材料

#### 10.1 试剂

10.1.1 无菌蒸馏水。

10.1.2 5% Chelex-100树脂。

10.1.3 5 U/μL 耐热DNA 聚合酶。

10.1.4 2.5 mmol/L dNTPs：dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

10.1.5 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>。

10.1.6 10×PCR缓冲液。

10.1.7 PCR引物见表1。

注：10.1.3~10.1.6试剂也用可商品化PCR反应预混液代替。

#### 10.2 设备和材料

10.2.1 生物安全柜。

10.2.2 恒温水浴锅。

10.2.3 电子天平：感量0.001 g、0.0001 g。

10.2.4 荧光定量PCR仪。

10.2.5 离心机：转速 $\geq$ 12000 r/min。

10.2.6 金属浴。

10.2.7 荧光定量PCR反应管及配套盖子。

10.2.8 微量移液器及吸头。

10.2.9 1.5 mL离心管。



表1 灭活动物双歧杆菌乳亚种定量检测用引物和探针

目的基因	引物与探针序列	片段长度/bp
<i>atp-D</i>	上游引物F: 5'-CAACAAGGAGCTTCAGGACA-3'	71
	下游引物R: 5'-TTCAGTGTGGTCTTGTCTTCC-3'	
	探针P: 5'-FAM-TCATCGCCCTCATCGGCATTGA-BHQ1-3'	

## 11 实验方法

PCR 试验环境条件和过程控制参照 GB/T27403 规定执行。

### 11.1 样品前处理

用电子天平精密称取适量样品，用无菌蒸馏水溶解混匀，制成悬浮液，并稀释至适宜浓度，待用。

### 11.2 提取样品基因组 DNA

取菌悬液200  $\mu$ L或其他适宜体积于1.5 mL离心管中，12000 rpm离心10 min后，弃上清，加入200  $\mu$ L浓度为5%的Chelex-100树脂(pH 8.0)溶液，涡旋混匀后，加入5  $\mu$ L蛋白酶K (20 mg/mL)混匀，56 $^{\circ}$ C孵育10~30 min，99 $^{\circ}$ C加热10 min，12000 rpm离心10 min，取上清作为DNA模板，待用。

### 11.3 提取和稀释定量参考品基因组 DNA

定量参考品：用经平板计数法测定具体浓度的动物双歧杆菌乳亚种对数期培养物，经真空冷冻干燥方法制备的数量确定的参考品。

取定量参考品一瓶，加入200  $\mu$ L 5%的Chelex-100树脂(pH 8.0)溶液，依据11.2方法提取定量参考品基因组DNA。

取10  $\mu$ L定量参考品基因组DNA，加入90  $\mu$ L无菌去离子水中，进行10倍稀释，依次1:10稀释至6个不同浓度。

### 11.4 荧光定量 PCR 检测

依据表2配制荧光定量PCR反应体系，也可用商品化PCR反应预混液按要求进行配制。

表 2 灭活动物双歧杆菌乳亚种定量检测用 PCR 反应体系

试剂	体积 (μL)	终浓度
10×PCR 缓冲液	2.5	-
25 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	2.5	2.5 mmol/L
2.5 mmol/L dNTP	2.0	0.2 mmol/L
引物 (10 μmol/L)	上下游各 1	0.4 μmol/L
探针 (10 μmol/L)	0.5	0.2 μmol/L
5 U/μL 耐热 DNA 聚合酶	0.25	0.05 U/μL
DNA 模板	5	-
无菌去离子水	10.25	-
总体积	25	-

注：无菌去离子水依据DNA模版体积确定。

荧光定量PCR扩增条件：95℃预变性5 min；95℃变性30 s，55℃退火30 s，40个循环，读取荧光信号。

### 11.5 对照和平行设置

每次荧光定量PCR检测时，使用已知浓度的参考品DNA模板作为阳性对照，使用无菌去离子水作为阴性对照；每个样品或对照设置2~3个平行。

### 11.6 计算

依据测得参考品的循环数阈值（Ct 值）和对应的菌浓度拟合线性方程，当  $R^2 \geq 0.99$  时，实验数据有效，当  $R^2 < 0.99$ ，建议重新进行测定。

依据测试样品的Ct值和线性方程，计算待测样品菌浓度。

注：建议参考品和待测样品Ct值均在10~30之间。

例：取参考品菌浓度的常用对数值，以对数值和Ct值拟合线性标准曲线方程 $y=ax+b$

其中，y—定量参考品菌浓度的常用对数值；

x—定量参考品的Ct值；

a和b—相关系数。

将样品Ct值带入标准曲线方程，计算样品菌浓度的常用对数值，即可推算出样品中的菌浓度。

## 12 结果与报告

根据测试结果出具报告，以“个/g(mL)”表示。