国内外益生菌食品质量安全评价技术概况

曾绮文，邓梅清，陆永成，陈玲，王青柏，林秀华，郭伟鹏*

（广东省科学院微生物研究所，广东省微生物分析检测中心，华南应用微生物国家重点实验室，广东省微生物安全与健康重点实验室，国家卫健委微生物食品营养与安全科技创新平台，国家卫生健康委员会食品安全风险评估与标准研制特色实验室，广东广州 510070）

摘要：随着益生菌食品市场规模的持续扩大，产品在菌种标示、活菌数量等方面的问题日益凸显，因此对益生菌食品的质量安全评价技术的要求也愈发提高。该文介绍了国际上典型的 QPS（Qualified Presumption of Safety）、GRAS（Generally Recognized as Safe）益生菌菌种安全性评价体系，以及部分国家和国际组织对于益生菌菌种的管理规定，梳理了国内外益生菌食品活菌含量的要求，系统总结了益生菌食品在菌种鉴定、安全性评价、活菌计数、消化道耐受性检测、肠道粘附性检测及功能性评价领域的技术发展及现行技术标准，旨在为构建适配行业发展的质量安全评价体系提供理论基础。

关键词：益生菌；鉴定；安全性评价；定量；技术

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.8.0811

Overview of Domestic and Foreign Quality and Safety Evaluation Technologies for Probiotic Foods

ZENG Qiwen, DENG Meiqing, LU Yongcheng, CHEN Ling, WANG Qingbai, LIN Xiuhua, GUO Weipeng*

(Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangdong Detection Center of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, National Health Commission Science and Technology Innovation Platform for Nutrition and Safety of Microbial Food, NHC Specialty Laboratory of Food Safety Risk Assessment and Standard Development, Guangzhou 510070, China)

Abstract: With the continuous expansion of the probiotic food market, issues related to product aspects such as strain labeling and the quantity of viable bacteria have become increasingly prominent. Consequently, the requirements for quality and safety evaluation technologies of probiotic food have also been increasingly improved. This article introduces the typical QPS (Qualified Presumption of Safety), GRAS (Generally Recognized as Safe) safety evaluation systems for probiotic strains internationally, as well as the management regulations for probiotic strains in some countries and international organizations. It also sorts out the requirements for viable bacteria content in probiotic foods both domestically and internationally, and systematically summarizes the technological development and current technical standards of probiotic foods in the fields of strain identification, safety evaluation, viable bacteria counting, gastrointestinal tolerance detection, intestinal adhesion capability detection, and functional evaluation of probiotic foods. The aim is to provide a theoretical foundation for constructing a quality and safety evaluation system that aligns with the development of the industry.

Keywords: Probiotics; Identification; Safety Evaluation; Quantification; Technology

益生菌是足量摄入时对宿主健康产生有益作用的活的微生物[1]，其定植于肠道上皮细胞，具有菌群平衡调节、定殖抗性及屏障保护的作用，能够改善机体的亚健康状态[2]，并可预防及治疗部分代谢性疾病[3,4]和免疫性疾病[5]。随着消费者健康认识的不断提高，以及益生菌食品技术水平的持续发展，全球益生菌食品市场正在稳步增长，2024 年全球益生菌食品市场规模增长率达到 7.4%[6]，中国益生菌食品市场规模预计 2026 年将突破 1 377 亿元[7]。

在当下益生菌食品行业蓬勃发展的背景下，益生菌食品在菌种标示、活菌数量、纯度等关键质量安全维度上，

收稿日期：2025-06-12；修回日期：2025-07-25；接受日期：2025-07-28

基金项目：国家重点研发计划项目（2024YFD2100900）

作者简介：曾绮文（1990-），女，硕士研究生，研究方向：微生物检测新技术；E-mail：531285091@qq.com

通讯作者：郭伟鹏（1974-），男，本科，教授级高级工程师，研究方向：微生物安全与健康，E-mail：guowp@yeah.net

仍潜藏着诸多不容忽视的问题。Diletta 等[8]对全球益生菌食品报告展开深入分析后发现，竟有高达 46%的产品存在菌种标注不当的情况，44%的产品活菌数量低于标签值，还有 16%的产品含有潜在病原体。这类问题此前曾引发产品召回[9]、退货[10]以及致病[11]等一系列不良事件，严重威胁着消费者的健康安全。由此可见，全面、深入且严格的食品安全评价，对于保障益生菌食品乃至整个食品行业的安全稳定发展，具有至关重要的意义。该文通过比较国内外益生菌食品质量安全管理要求及评价技术，为提升益生菌食品检测的有效性及完善的益生菌食品评价体系提供参考。

1 国内外益生菌食品的安全管理要求

目前国外较为成熟的食品用菌种安全性评价体系包括欧盟的安全资格认证（Qualified Presumption of Safety，QPS）体系、美国的公认安全（Generally Recognized as Safe，GRAS）体系。QPS 由欧洲食品安全局（European Food Safety Authority，EFSA）进行管理，对菌株分类学地位、现有知识体系、潜在致病性、最终用途 4 个方面进行评估[12]。GRAS 由美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）管理，当前有自主认定 GRAS 和备案通告 GRAS 两种监管途径[13]。

放眼全球，多个国家已相继构建起益生菌安全标准的监管体系，且这一架构正随着时代发展不断演进。日本是全球首个实施功能性食品和营养保健品监管体系的国家，若益生菌产品作为特定保健用食品（Foods for Specified Health Uses，FOSHU）上市，必须提供功效和安全性的相关证据，并获得日本厚生劳动省（Ministry of Health and Welfare，MHLW）的批准[14]。加拿大卫生部实施了用于天然健康产品的益生菌专论，其中明确规定了安全标准，且会根据最新的科学进展和认识持续更新内容，其构建的益生菌法规监管框架，被多个国家推崇为最佳模式[15]。印度食品安全标准局（Food Safety and Standards Authority of India，FSSAI）依据《食品安全与标准法》及《保健品、营养补充品、特殊膳食用食品、特殊医疗用途食品以及含益生元和益生菌的食品条例（2022）》[16]对益生菌的菌种使用和产品要求进行管理。国际相关行业协会如国际乳品联合会（International Dairy Federation，IDF）也在积极推动食品用微生物菌种名单的出台与更新，如《发酵食品用菌种名单》[17]。

中国通过“名单制”对食品用菌种进行严格管理，只有《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》和《可用于婴幼儿食品的菌种名单》名单内的菌种才能被应用于益生菌食品，对名单外的新菌种则按照《新食品原料安全性审查管理办法》执行[18]。近年来，随着益生菌研究的不断深入，我国对益生菌食品的管理与相关标准法规处于不断完善之中，《保健食品原料用菌种安全性检验与评价技术指导原则（2020 年版）》、《食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序》GB 31615.2-2025 等技术文件的发布，进一步规范指导我国益生菌食品用菌种的安全性评价，保障益生菌食品安全。

2 国内外益生菌食品的活菌含量要求

关于活菌摄入量的标准，国际益生菌和益生元科学协会（The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics，ISAPP）[19]建议，益生菌的每天最低活性摄入量应达到 10^8 CFU/d。美国 FDA 和 EFSA 虽未硬性规定统一的活菌数量标准，但通过一系列法规确保益生菌产品的质量和真实性，包括但不限于企业应基于科学证据、标签合规性和菌种特性来确定适宜的剂量，并避免未经批准的健康功效宣传。尽管国际上对于益生菌食品中活菌数量的要求存在差异，但普遍要求产品在保质期内的活菌数不低于 10^6 CFU/g (mL)或 10^9 CFU/份（见表 1 和表 2）。

表 1 国外部分国家/组织对于益生菌食品活菌含量的要求

Table 1 Requirements for the viable bacteria content of probiotic foods in some foreign countries/organizations

国家/组织	监管规定	活菌含量要求	文献
意大利	益生菌及益生元指南(2018)	建议食用的益生菌产品应含有至少 1 个菌种的活菌数达到 10^9 CFU/份，当有充分的科学依据支持所使用的菌种在肠道中具有定植能力，可以降低其活菌数	[20]
加拿大	有关微生物的健康声称及“益生菌”术语的使用(2024)	保质期内非特定益生菌活菌数≥10^9 CFU/份	[21]
巴西	食品补充剂管理法规（规范性指令-2024 年 3 月 7 日第 284 号）	供 1 岁以下婴儿的鼠李糖乳杆菌 GG(DSM 33156)活菌数≥10^{10} CFU/份，其他年龄人群及其他益生	[22]

		菌活菌数≥10^9 CFU/份	
阿根廷	阿根廷食品法典第 6/2023 号联合决议	含发酵乳饮品中乳酸菌总数≥10^6 CFU/g; 发酵乳饮品中乳酸菌总数≥10^7 CFU/g	[23]
泰国	作为食品成分的益生菌的应用(2010)	保质期内活菌数≥10^6 CFU/g	[24]
联合国粮农组织和世界卫生组织联合委员会(FAO/WHO)	国际食品法典标准 发酵乳 CXS 243-2003(2024 年修正版)	在保质期内，相关产品特定益生菌（如酸奶中的嗜热链球菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种）活菌数≥10^7 CFU/mL (g)，其余益生菌活菌数≥10^6 CFU/mL (g)	[25]

表 2 国内对于益生菌食品活菌含量的要求

Table 2 Requirements for the viable bacteria content of probiotic foods in China

类别	规定/标准名称	活菌含量要求	文献
监管规定	益生菌类保健食品申报与审核规定（试行）（国食药监注[2005]202 号）	保质期内活菌数≥10^6 CFU/g (mL)	[26]
国家标准	食品安全国家标准 发酵乳 GB 19302-2025	乳酸菌活菌数≥10^6 CFU/g (mL)	[27]
	食品安全国家标准 饮料 GB 7101-2022	乳酸菌活菌数≥10^6 CFU/g (mL)	[28]
	食品安全国家标准 婴儿配方食品 GB 10765-2021	活菌数≥10^6 CFU/g (mL)	[29]
	食品安全国家标准 幼儿配方食品 GB 10767-2021	活菌数≥10^6 CFU/g (mL)	[30]
	食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品 GB 10769-2025	活菌数≥10^6 CFU/g (mL)	[31]
	食品安全国家标准 特殊医学用途婴儿配方食品通则 GB 25596-2025	活菌数≥10^6 CFU/g (mL)	[32]
	食品安全国家标准 特殊医学用途配方食品通则 GB 29922-2013	活菌数≥10^6 CFU/g (mL)	[33]
	含乳饮料 GB/T 21732-2008	出厂期乳酸菌活菌数≥10^6 CFU/mL	[34]
地方标准	益生菌及其制品生产技术规范 DB43/T 2903-2024	益生菌原粉：活菌数≥10^{11} CFU/g; 益生菌制品：保质期内活菌数≥10^7 CFU/g (mL); 含益生菌制品：保质期内活菌数≥10^6 CFU/g (mL)	[35]
行业标准	凝结魏茨曼氏菌菌粉 QB/T 5940-2024	原料型：保质期内活菌数≥10^{11} CFU/g; 即食型：保质期内活菌数≥10^8 CFU/g	[36]
	食品用菌种制剂 QB/T 4575-2023	原料型：保质期内活菌数≥10^{10} CFU/g (mL); 即食型：保质期内活菌数≥10^8 CFU/g (mL)	[37]
团体标准	益生菌制剂食品 T/CHC 1014-2024	保质期内活菌数≥10^7 CFU/g (mL)	[38]
	食品用益生菌通则 T/CIFST 009-2022	保质期内活菌数≥10^8 CFU/g (mL)	[39]

3 国内外益生菌食品的质量安全评价技术

3.1 益生菌的鉴定技术

益生菌的鉴定技术经历着技术迭代与效能跃升，其鉴定方法主要分为表型、基因型、光谱型[40]。表型鉴定法从依赖人员经验的形态观察和生理生化鉴定法（如梅里埃 API 微生物鉴定系统），到 Biolog 微生物自动鉴定系统的问世，表型鉴定技术迈入自动化时代。

在基因型鉴定法中，基于保守基因的鉴定方法主要包括 16S rRNA 基因测序、多位点序列分型（Multi-Locus Sequence Typing，MLST），前者涉及扩增细菌 16S rRNA 基因并进行测序，随后与公共数据库如 NCBI、EZBioCloud 进行比对，以实现快速鉴定到属或种水平。然而，由于扩增区域的高保守性，该方法在区分近缘种方面存在局限性，难以鉴别菌株的特异性。相比之下，MLST 方法通过对多个保守管家基因（例如 *rec*A、*dna*K、*phe*S 等）进

行测序，利用等位基因组合来确定菌株的型别，从而将分辨率提升至种或菌株水平[41]，该技术在益生菌溯源研究中具有重要应用价值。

脉冲场凝胶电泳（Pulsed Field Gel Electrophoresis，PFGE）、核糖体分型（Ribotyping）、随机扩增多态性 DNA（Random Amplified Polymorphic DNAs，RAPD）等技术也是常见的基因型鉴定方法。PFGE 是大规模流行病学调查中菌株分型的最常用方法之一[42]，它基于使用稀有切割限制酶（如 *Apa*I、*Asc*I、*Sma*I、*Xba*I）消化染色体 DNA，随后将所得消化产物在琼脂糖凝胶中通过交变电场进行分离，PFGE 可以分辨最大超过 1Mb 的 DNA 片段大小[43]。王营等[44]采用 PFGE 对酸乳中的保加利亚乳杆菌及嗜热链球菌不同菌株进行分型。PFGE 作为在微生物分型领域被广泛认可的“金标准”，可重复性好，分辨率高[45]，可以对微生物进行菌株水平上的区分[44]，然而也存在着培养周期冗长，以及操作和结果解读过程复杂的难题。Ribotyping 使用限制性内切酶对全基因组 DNA 进行酶切，DNA 片段经过电泳分离后转移到膜上，然后用放射性标记的核糖体探针杂交转移的 DNA 片段，形成核糖体分型基因指纹图谱。Ribotyping 可重复性强，且一个探针即可用于对全部样本进行亚型检测[46]。不过，该技术存在一定局限性，单次进样量仅为 8 个样本，且需间隔 2 小时才能进行下一批样品的操作[47]，因此不适用大批量样品的检测场景。RAPD 是一种基于片段集合的侧支扩增过程，使用短链寡核苷酸作为随机引物，在低退火温度条件下完成核酸扩增。Herbel[48]使用该方法成功区分瑞士乳杆菌、清酒乳杆菌、植物乳杆菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种。该方法易于实施、成本低廉，但其可重复性相对较低[49]，鉴别能力低于 PFGE[50]。

由规律成簇的间隔短回文重复序列（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats，CRISPR）及其相关蛋白（CRISPR-associated proteins，Cas）构成的 CRISPR-Cas 技术相比其他基因型鉴定技术，CRISPR-Cas 技术在特异性、反应时间等方面具有显著优势，但在检测低浓度靶标时，存在局限性[51]，因此通过与多种核酸扩增技术结合，可以提高其检测灵敏度[52]。有研究表明 CRISPR-Cas 结合环介导等温扩增技术（Loop-mediated Isothermal Amplification，LAMP），可在恒温条件下高效扩增靶标 RNA/DNA，大幅提高了检测的特异性和灵敏度，1 小时即可完成食源性病原菌鼠伤寒沙门氏菌的鉴定[53]。目前 CRISPR-Cas 技术在益生菌鉴定方面的应用尚不多见，但凭借其出色的生物识别能力和靶向切割功能，该技术在益生菌鉴定领域展示出广阔的应用前景。

基于全基因组分析的鉴定技术包括全基因组测序（Whole Genome Sequencing，WGS）的核心基因组 MLST（Core Genome MLST，cgMLST）、全基因组 MLST（Whole Genome MLST，wgMLST）和单核苷酸多态性（Single Nucleotide Polymorphism，SNP）分析，这些方法均需通过测序手段获取微生物的全基因组信息，其中 cgMLST 聚焦核心基因组，可实现快速准确的菌株分型；wgMLST 覆盖全基因组，能够实现快速且准确的菌株分型具有极高的分辨率，能够细致区分亲缘关系极近的菌株[46]，优于 PFGE 鉴别能力[54]。cgMLST 和 wgMLST 均适用于大规模菌株筛查的场景[54]，与 wgMLST 相比，cgMLST 分析考虑的基因组位点数少，对数据质量、阈值的要求相对较低，能够满足大多数情况下对菌株的溯源及系统发育分析要求，因而更常用于流行病学分析[54,55]。SNP 分析通过检测微生物基因组特定位点的核苷酸变异实现分离株的鉴别。作为所有基于测序的分型技术中分辨率最高的方法，SNP 分析可在菌株水平对微生物进行精准区分[46]。Song 等[56]基于全基因组分析方法识别菌株特有的 SNP，并根据这些独特的 SNP 标记设计了聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）引物，准确且可重复地将益生菌在菌株水平识别。要确保 SNP 分析结果的准确性和一致性，需采用严格的质量标准，包括最小覆盖范围和 SNP 之间允许的距离等，而基因组装方法的不同导致测序数据结果的差异[54]，所以构建并共享跨不同研究组的数据库，并选定合适的参考基因组，方能确保结果的可比性与可靠性[57]。

针对混合样本的分析，通过宏基因组测序技术可以获取样本中全部基因组信息。利用生物信息学方法，可以识别出益生菌与污染杂菌的存在情况，并进一步预测与安全性相关的耐药基因、毒力因子等信息。

此外，借助光学工具开展食品微生物监测成为近年来研究领域的热点方向之一。光谱型（Spectroscopic Typing）应用比较多的有基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry，MALDI-TOF MS）、傅里叶变换红外光谱（Fourier Transform Infrared Spectroscopy，FTIR）、拉曼光谱（Raman Spectroscopy），与基因型鉴定技术相比，基于光谱型鉴定技术侧重于从各种分子结构单元（如蛋白质、脂质、多糖和核酸）收集的大量光谱特征[58]，代表了菌种鉴定和分型领域的一个重要范式的转变，具有快速鉴定的优点。

MALDI-TOF MS 技术的应用，标志着菌种鉴定技术进入高通量的全新阶段。MALDI-TOF MS 技术通过将待测微生物（如益生菌单菌落）与有机基质（如 α-氰基-4-羟基肉桂酸，HCCA）混合后点在靶板上，基质吸收激光

能量并促进微生物蛋白的离子化；采用脉冲激光（如氮激光，337 nm）轰击样品，使基质-蛋白共结晶升华，生成带电荷的肽和蛋白离子。离子在电场中加速，根据质荷比（m/z）不同到达检测器的时间差异形成质谱图。将获得的质谱峰图（*m/z* 2 000~20 000 Da）与商业数据库（如 Bruker 的 MBT 库、VITEK MS 或自建库）比对，实现菌种/菌株水平鉴定。该技术在鉴定单一菌株耗时少于 15 分钟，单次运行可处理多样本且成本低廉，显著提升了鉴定效率[59]。FTIR 采用多色红外光作为光源，在以特定波长的激光持续辐照细菌样本后，针对样本成分的转动与自旋状态展开分析[48]。Deidda 等[60]利用 FTIR 对双歧杆菌菌株进行分型发现，FTIR 能区分出动物芽孢杆菌乳酸亚种组内 PFGE、WGS、MLST 都无法鉴别的菌株。拉曼光谱法是以拉曼散射效应为基础，通过检测分子的振动、转动特征，实现对分子结构分析的技术方法[45]。为提升检测灵敏度，目前常采用表面增强拉曼光谱技术（Surface-Enhanced Raman Spectroscopy，SERS）对原有光谱信号进行放大处理，SERS 结合微流控技术可在 1 分钟内完成乳酸菌的快速鉴定[61]。此外，还有报道指出运用高光谱技术[62]、荧光光谱技术[63]、太赫兹时域光谱技术[64]可对乳杆菌实现快速鉴别，这些新兴技术都可作为菌种鉴定的辅助手段。

在益生菌“株水平”的精准鉴定工作中，全基因组测序是首选工具，尽管该方法存在耗时较长的局限性。为提升益生菌鉴定工作的准确性与效率，建议采用基因型技术与表型或光谱型技术相结合的策略。鉴定的水平不仅取决于鉴定技术本身的灵敏度，还与该鉴定技术相关的参考数据库体量规模密切相关，建立并完善标准菌株数据库，有利于菌株样品的准确分型。在现行的标准体系中，表型鉴定法、PCR 法、MALDI-TOF MS 法均为常用的微生物鉴定方法。不同分型方法原理和效果具有差异性，在实际操作过程中，应根据目标菌株的生物学特性、流行病学数据以及具体的应用场景选择合适的鉴定方法，实现益生菌鉴定溯源分析（见表 3）。

表 3 国内外益生菌鉴定的标准

Table 3 Standards for probiotic identification at home and abroad

类别	标准	技术	文献
国际标准	酸奶-特征微生物的鉴定（德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌）ISO 9232:2003	表型鉴定法	[65]
国外标准	美国药典	PCR 法	[66]
	细菌学分析手册	表型、基因型、光谱型如 FTIR	[67]
	IDF 公报 No.513/2021 益生菌菌株水平鉴定指导文件	菌株鉴定方法有 MALDI-TOF MS 与 FTIR 联用、基于 WGS 的 SNP 和 MLST 分析、PFGE、Ribotyping、RAPD、菌株特异性 PCR 等	[68]
国家标准	食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验 GB 4789.35-2023	表型鉴定法/实时荧光 PCR 法	[69]
	食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验 GB 4789.34-2016	表型鉴定法	[70]
	生物产品中功能性微生物检测 GB/T 34224-2017	表型鉴定法	[71]
	基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则 GB/T 33682-2017	MALDI-TOF MS 法	[72]
行业标准	食品用乳酸菌鉴定技术指南 QB/T 5165-2017	表型鉴定法和 PCR 法相结合	[73]
团体标准	微生物快速鉴定 质谱法 T/CITS 257-2025	MALDI-TOF MS 法	[74]
	食品中马克斯克鲁维酵母的定性检验 PCR 法 T/SSFS 0012-2024	PCR 法	[75]
	食品微生物学检验 食品用乳酸菌菌株鉴定方法 T/CAAPP 00011-2021	PCR 法	[76]
	基于全基因组测序的益生菌菌株分型鉴定指南 T/SZAS 22-2020	全基因组测序法	[77]
	实验动物 木糖葡萄球菌检测方法 T/CALAS 92-2020	表型鉴定法	[78]

3.2 益生菌的安全性评价技术

食品用的益生菌菌种应具有传统使用历史，对于新开发的益生菌菌种，在其进入市场前，必须对其安全性进行全面有效的评估。《食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序》GB 31615.2-2025[79]里要求，一个新的菌株在开展安全性评价时，一般需要进行以下试验：菌种鉴定、遗传稳定性分析、全基因组测序、产毒试验、耐药性试验、动物致病性试验以及毒理学试验。

部分菌株在代谢过程中可能产生有毒代谢产物，如溶血素、D-乳酸、生物胺等，因此，对菌株的产毒能力进行评估是必要的。产毒试验应涵盖多种基质和条件，以确保评估结果的准确性和全面性。我国的《保健食品原料用菌种安全性检验与评价技术指导原则（2020 年版）》[80]和《食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序》GB 31615.2-2025[79]均对菌株的产毒试验作出了明确的要求，首先采用全基因组测序技术对拟评价菌株的遗传物质进行分析，然后与已有的数据库，包括但不限于毒力基因数据库（VFDB）、毒力/致病岛数据库（PAIDB）、生物防御数据库（MvirDB）等最新版本中存储的序列进行比对，以识别与已知致病相关的毒力因子和毒素代谢相关基因（如溶血素、肠毒素、表皮毒素等）的存在情况，随后结合多培养基培养和相关国家/国际组织标准检测进行毒素（或抗菌物质）含量（或活性）检测。对于直接添加至 1 岁以下婴儿食品中的菌种，则必须开展 D-乳酸含量测定[79]。除细菌菌株外，对于真菌菌株产生的真菌毒素、放线菌菌株产生的抗菌物质或藻类菌株产生的藻类毒素，都需依据相应食品安全国家标准中规定的检验方法或其他经验证的等效方法实施检验[79]。

对于新开发的益生菌菌种应建立抗生素耐药性模型且确认无耐药性转移的风险。在《食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序》GB 31615.2-2025[79]与 EFSA 发布的《关于评估对人类和兽医重要抗菌药物的细菌敏感性指南》[81]中，对于食品用菌种抗菌药物的评估标准存在相似之处。两者均规定必须确定菌种对氨苄西林、万古霉素、庆大霉素等 9 种抗生素的最低抑菌浓度（MIC），对于特定菌种，还需进一步测定其对环丙沙星、泰利霉素、黏菌素、磷霉素的 MIC 值。通过将测定结果与菌种公开的 MIC 折点值进行对比分析，若 MIC 值未超过折点值，则可判定该菌种为安全菌种；若超过折点值，则需要对其抗性进行遗传学的分析。益生菌的耐药性包括固有耐药性和获得性耐药性，固有耐药性一般不会水平转移，获得性耐药性可通过接合、转导和转化等方式水平转移耐药基因。目前，关于益生菌抗生素的敏感性试验尚未形成标准化方法，需在分子水平上鉴定耐药基因并评估其转移风险[82]。若菌种携带的耐药基因位于染色体上，或者其耐药机制是由染色体突变引起的，那么该菌种水平传播耐药性的可能性较低，可视为安全菌种；若位于可移动遗传元件上，表明该菌种具有水平传播的潜力，则认为该菌种是不安全菌种。

动物致病性试验及毒理学试验是评估益生菌的安全性的重要手段。在我国，《保健食品原料用菌种安全性检验与评价技术指导原则（2020 年版）》[80]与《食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序》GB 31615.2-2025[79]均对菌种的致病性评价做出了明确要求，但不同的是，前者要求所有拟评价的菌种必须使用腹腔注射和经口灌胃两种途径给予动物受试物，后者对国内外有安全使用历史且对人和动物健康无不良反应的菌种,可只通过经口灌胃方式给予动物受试物。毒理学评价则根据拟评价菌种在国内外使用的情况，依据食品安全国家标准 GB 15193.1 相关评价程序和方法，对食品用菌种进行不同的毒理学组合试验，包括急性经口毒性试验、90 天经口毒性试验、遗传毒性试验、致畸试验和生殖毒性试验。美国 FDA 正努力开发与应用基于支架和细胞构建的组织或器官模型、三维细胞培养（微生理）平台、基于计算机建模模拟的非生物性测试技术等毒理学替代方法，达到替代、减少和改进传统的动物毒理学试验的目标[83]。毒理学替代方法可帮助加速产品开发，是未来益生菌安全性评价的重要发展方向。

另外，根据《食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序》GB 31615.2-2025[79]，还需对菌种遗传稳定性进行分析，即评估 1 个生产周期内最多传代次数 2 倍以上代数的菌种关键指标或特征的遗传稳定性，比如传代后比对性状、代谢产物、关键基因、发酵特性等是否稳定。联合国粮农组织（Food and Agriculture Organization, FAO）和世界卫生组织（World Health Organization，WHO）的《食品益生菌评价指南》[1]指出，益生菌产品销售市场后，对消费者使用后出现的各种不良事件，应进行流行病学监测。

值得注意的是，益生菌可能对免疫功能低下的人群带来巨大的健康风险。Besselink 等[84]研究发现，对重症急性胰腺炎患者使用益生菌，并不能降低感染并发症的风险，反而与患者死亡率增加相关。Davidson 等[85]研究发现，肥胖的孕妇服用益生菌患先兆子痫风险增加。ISAPP 在 2022 年召开的会议中就益生菌使用相关的不良事件报告进行讨论，建议针对脆弱人群如早产儿、免疫低下者、孕妇等的益生菌使用应经过严格测试以达到适合该人群的质量标准[86]。近年来患病动物模型（如心内膜炎模型、免疫缺陷模型和结肠炎型）越来越多地被使用[87,88]，通过选

取免疫抑制或严重虚弱的宿主，以及通过使用不寻常的给药途径，以便检测候选益生菌菌株的任何潜在致病性[89]。当使用对免疫功能低下的人群有健康风险的菌株（如鼠李糖乳杆菌 GG (DSM 33156)、植物乳杆菌 CECT 7529）时，需要在食品标签上注明“免疫功能低下或患有严重健康状况的人群不宜食用”的安全警告[22]。

3.3 益生菌的定量检测技术

平板计数法是微生物定量分析的经典方法，基于代谢表型差异的选择性培养基可对微生物在菌属层级上进行定量检测。平板计数法虽然检测成本低廉，但检测周期较长，且无法检出活的非可培养（Viable But Non-Culturable，VBNC）状态的益生菌。

流式细胞术（Flow Cytometry，FCM）通过 DNA 结合染料（如 SYTO 9）和碘化丙啶（PI）的联用，可以在单细胞水平对菌种进行定量检测的同时对活细胞与死细胞进行分选。SYTO 9 能够穿过所有细菌细胞膜，而 PI 只能进入细胞膜受损的细胞，从而能够区分活细胞和死细胞。FCM 具有高通量，低变异、检测速度快等特点[90]，Michelutti 等[91]分别采用 FCM 和平板计数法对嗜酸乳杆菌、动物双歧杆菌等样本进行检测，结果发现两种方法的检测结果无显著差异，且与平板计数法相比，FCM 的检测时间从 3 天大幅缩短至 2 小时。

在实际生产实践中，部分益生菌食品经营者会通过混合菌种提高产品的活菌数量，这些混合物中可能包含大量发酵菌，而这些发酵菌并不属于益生菌范畴。因此，开展带有菌种筛选功能的计数方法的研究与应用，对于准确评估益生菌食品品质具有重要意义。实时荧光定量 PCR（Real-Time Quantitative PCR，qPCR）通过设计特异性引物，能够精准区分和定量复合益生菌食品中的不同菌种，结合 PMA 染料（PMA-qPCR），可以选择性检测单一菌种的活菌数量，Marole 等[92]采用 PMA-qPCR 技术对复合益生菌酸奶中的鼠李糖乳杆菌、长双歧杆菌及酸奶发酵菌种进行定量检测，结果显示该方法对目标菌株具有高特异性，可实现对活性细胞的精准定量，与平板计数法相比，二者检测结果具有良好相关性，但比平板计数法具有更高的选择性、更短的检测周期。数字 PCR（Digital PCR，dPCR）作为第三代核酸扩增技术，相较于 qPCR 技术，其显著优势在于无需依赖标准曲线便能直接对目标核酸分子进行绝对定量分析[93]，微滴式数字 PCR[94]、三重数字 PCR[95]等技术对于菌种鉴定的灵敏度更是有进一步提升。Wang 等[94]针对鼠李糖乳杆菌 HN001 设计引物和探针，运用 ddPCR 技术结合使用脱氧胆酸钠和 PMA，实现对复合益生菌产品中活性鼠李糖乳杆菌 HN001 株水平上的快速定量检测。

环介导等温扩增（Loop-mediated Isothermal Amplification，LAMP）在恒温条件下对 DNA 进行扩增，该技术不需要热循环，与 PCR 相比，检测时间较短，有研究显示 LAMP 技术能在 45 分钟内快速定量益生菌产品中的长双歧杆菌亚种[96]。此外，双抗夹心酶联免疫吸附技术[97]、三磷酸腺苷（ATP）生物发光技术[98]、磁珠捕获技术[99]、电阻抗技术[100]等技术的发展也为益生菌定量检测提供了新的方向。

我国正极力推进制定更快速的益生菌活菌计数检测标准，流式细胞术、PCR 相关衍生技术已在标准层面上作为产品中活菌计数的技术支撑，成为培养依赖的平板计数法的有效补充（见表 4）。在微生物定量领域，平板计数法无需复杂的仪器，试验成本低，但培养周期长，适合常规的质控场景；FCM 能检测出平板计数法难以培养的 VBNC 状态菌种，适合 VBNC 状态菌种的定量分析或高通量筛选场景，但 FCM 缺乏菌种特异性识别能力[101]，难以从复合益生菌中对某一菌种生物量进行准确定量；PCR 法通过设计特异性引物，能够精准区分和定量复合益生菌食品中的不同菌株，有利于食品溯源与安全监测，但对操作人员技能要求高；LAMP 法一般 1 小时内即可完成扩增[96]，检测周期短于 PCR 法，但定量精度低于 PCR 法[102]，适合定性或半定量检测的现场快速检测。实际应用中需根据检测样本类型、时效要求及成本预算综合选择，必要时可联用多种方法以提升检测准确性和效率，也可以借助新兴技术如纳米传感器，提高检测效率与精度。纳米传感器使用的纳米材料（如金纳米颗粒、量子点、磁性纳米微珠）[103]通常与酶、抗体和核酸等生物分子结合，以达到所需的特异性。当生物受体与目标病原体形成牢固连接时，它会引起光学、热学或电学特性的改变，以更强的信号被传感器检测到，以提高检测效率[104]。有研究表明金纳米颗粒增强的免疫层析试纸条对大肠杆菌灵敏度比传统的光学试纸条方法高约 10 倍[105]。基于金纳米颗粒的双抗夹心酶联免疫吸附法可在 3 小时内快速测定牛奶中鼠伤寒沙门氏菌[106]。

表 4 国内外益生菌活菌计数的标准

Table 4 Standards for viable bacteria counting of probiotics at home and abroad

类别	标准名称	微生物	检测方法	文献
国际标准	乳制品双歧杆菌计数 菌落计数法 ISO 29981:2024	双歧杆菌	平板计数法	[107]
	食物链中的微生物学-微生物检测与定量的聚合酶链式反应（PCR）-通用要求和定义 ISO 22174:2024	食源性病原菌通则，可适配益生菌	qPCR 法	[108]
	乳及乳制品发酵剂、益生菌及发酵产品中乳酸菌计数 流式细胞仪法 ISO 19344:2015	乳酸菌/双歧杆菌	流式细胞仪法	[109]
	食品和动物饲料的微生物学-用于检测和定量食品病原体的聚合酶链式反应(PCR)-性能特性 ISO 22118:2011	乳酸杆菌	PCR 法	[110]
	乳制品选择培养基上假定嗜酸乳杆菌计数 37 ℃菌落计数法 ISO 20128:2006	嗜酸乳杆菌	平板计数法	[111]
	酸奶 特性微生物的计数 37 ℃菌落计数法 ISO 7889:2003	嗜热链球菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种	平板计数法	[112]
	食品和动物饲料微生物学 嗜温性乳酸菌计数的通用方法 30 ℃菌落计数法 ISO 15214:1998	乳酸菌	平板计数法	[113]
国外标准	美国药典	乳酸菌	平板计数法	[114]
	俄罗斯药典	双歧杆菌	平板计数法	[115]
国家标准	食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验 GB 4789.35-2023	双歧杆菌、乳杆菌、嗜热链球菌、乳酸菌总数	平板计数法	[69]
	食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验 GB 4789.34-2016	双歧杆菌	平板计数法	[70]
行业标准	食品用菌种制剂 QB/T 4575-2023	唾液链球菌嗜热亚种、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、双歧杆菌属、明串珠菌属、乳酸乳球菌属、片球菌属	平板计数法	[37]
	凝结魏茨曼氏菌计数方法 QB/T 5949-2023	凝结魏茨曼氏菌	平板计数法	[116]
	出口乳制品中乳酸菌检测方法 数字 PCR 计数法			[117]
	SN/T 5642.1-2023	青春双歧杆菌	数字 PCR 法	
	SN/T 5642.2-2023	两双歧杆菌		
	SN/T 5642.3-2023	动物双歧杆菌		
	SN/T 5642.4-2023	植物乳杆菌		
	SN/T 5642.5-2023	鼠李糖乳杆菌		
	SN/T 5642.6-2023	嗜酸乳杆菌		
	SN/T 5642.7-2023	副干酪乳杆菌		
	商品化试剂盒检测方法 乳酸菌总数方法 SN/T 5451-2022	乳酸菌	试剂盒法（预先制备好的培养基系统）	[118]
	乳及乳制品发酵剂、发酵产品中乳酸菌计数 流式细胞仪法 SN/T 5436-2022	乳酸菌	流式细胞仪法	[119]

团体标准	食品用菌种检验 鼠李糖乳酪杆菌检验 PMA-qPCR 法 T/CIFST 020-2024	鼠李糖乳酪杆菌	PMA-qPCR 法	[120]

3.4 益生菌的消化道耐受性检测技术

《食品益生菌评价指南》[1]里指出，益生菌必须能够在通过胃和接触胆汁的情况下存活。食用的益生菌数量并不等同于到达肠道的益生菌数量，Azhar[121]等抽取市售的 10 款益生菌产品进行胃液耐受性试验，结果显示只有进行了包埋处理的 2 款产品存活率能达到 50%以上，无包埋处理的产品中有 2 款产品存活率不足 30%，其余产品则完全失活。真正活着到达肠道的益生菌数量才是实现益生作用的保证，胃液、肠液耐受性评价方法的建立是评估益生菌质量的关键。目前的研究主要通过调节培养基的 pH 值与添加胆盐的方式，体外静态初步模拟胃部的强酸环境及肠道中的胆盐环境。《益生菌剂胃液耐受性检验方法》T/CNHFA 435-2024[122]在标准层面规范了模拟胃液的制备及模拟胃液条件的选择（包括标准模拟胃液、空腹模拟胃液、饱腹模拟胃液的 pH 值和处理时间），建立了胃液耐受性的检验方法。体外动态消化模型可模拟消化器官蠕动收缩、消化液连续分泌等动态消化过程，更接近真实的消化系统，应用比较广泛的主要有胃肠道 TIM 模型、人体肠道微生态模拟器 SHIME 系统、工程胃和小肠 ESIN 系统等[123]。然而，该领域目前尚未建立标准化框架，缺少统一的模型、规范化的评价指标及标准化的检测方法。

3.5 益生菌的肠道粘附性检测技术

益生菌在肠道内附着于上皮细胞的能力是一个至关重要的特征，只有具备粘附能力，益生菌才能在肠道内定植，从而实现预期的健康效益[124]。对益生菌进行碳氢化合物（如正己烷、二甲苯、甲苯、氯仿以及乙烯等）粘附性试验[125]，由于自聚集性、疏水性和粘附性正相关[126]，可以间接反映菌株的粘附性；上皮细胞系（例如 Caco-2、HT-29、IPEC-J2）粘附性试验是评估益生菌粘附性的另一种方法[125,127]。然而，由于目前尚未形成标准化的评估方法，不同研究在实验设计中存在显著差异，如试剂/细胞类型的选择，初始菌液负载量的设定，培养温度、孵育时间等关键参数的控制，这些差异导致很难对现有的研究结果进行横向比较，也难以构建起具有可比性的系统关联。

3.6 益生菌的功能性评价技术

根据《食品益生菌评价指南》[1]，益生菌功能性评价包括体外试验、动物试验和人体试验。体外试验主要是验证益生菌的抑菌、抗氧化等生理活性，动物试验主要是观察其对动物肠道健康、免疫等方面的影响，人体试验可以综合反映益生菌在人体内的效果。我国依据《保健食品功能检验与评价方法（2023 年版）》[128]，对益生菌食品进行规范的功能性检验与评价。人体试验需要满足随机、双盲、安慰剂对照的设计要求。Matsumoto 等[129]对养乐多®活菌型乳酸菌乳饮品（含干酪乳酸菌代田株）进行人体试验，与安慰剂相比，饮用该益生菌乳饮品会使粪便变硬，且粪便中分离出的干酪乳杆菌代田株的回收率很高，证明该该益生菌乳饮品具有调节肠道的功能。人体试验虽然能直接客观地评价益生菌在人体内的功能性，但是试验周期长，成本高，而且如果临床试验数量不够大，不足以具有科学上可接受的统计意义[130]。在人工智能时代，机器学习与 AI 算法不仅可以深入挖掘微生物功能基因特征，在益生菌益生机制解析方面也有良好应用前景。人工智能模型辅助基因组学、代谢组学等技术，可以解析庞大且多样的微生物组数据，聚类算法通过代谢物功能相似性分组，识别与健康问题相关的生物标志物，并建立宿主-微生物互作模式[131]，进而对益生菌菌株进行功能性评价。内蒙古农业大学研究团队开发了一种基于机器学习算法和基因组大数据的益生乳酸菌筛选和预测平台，成功挖掘到与益生特性相关的基因和代谢通路[132]。已有报道显示，目前已存在能够预测益生菌在治疗肠易激综合征和炎症性肠病方面的成功率的人工智能模型[133,134]。

4 结语与展望

尽管各国的益生菌食品质量安全监管制度存在差异，但对菌种安全性和活菌数量水平的把控已形成国际共识。在当下市场环境中，仍有一些不良商家存在以次充好的违规行为，市场乱象（如菌种虚假标注、活菌数不达标）仍制约行业健康发展。作为市场监管和质量控制的关键技术支撑，科学灵敏的评价技术直接影响着益生菌产业发

展的规范性和可持续性。当前，益生菌食品检测技术体系仍存在诸多亟待解决的问题。在菌种鉴定方面，现行的标准体系中以形态观察及生化试验的表型鉴定法对于亲缘关系相近的菌种的鉴定存在显著的局限性，建议配合采用管家基因测序等基因型鉴定技术，以提高菌种鉴定的准确性。在益生菌定量检测方面，平板计数法依然是国际公认评估益生菌含量的金标准，但对于益生菌食品这类快消类产品，传统检测方法难以满足时效性需求，建议引入流式细胞术、qPCR 等快速检测技术作为常规检测手段，同时以平板计数法建立结果验证与质量监控的双重保障体系。针对婴幼儿食品用益生菌和保健食品类益生菌，相关管理规定需具体至菌株水平，这是由于不同菌株间存在单核苷酸多态性差异，这种差异会导致菌株遗传特性与功能表现的多样性。然而，菌株间的基因序列具有高度相似性，这给益生菌的株水平的鉴定和定量检测工作带来了极大的挑战。鉴于此，通过构建关键菌株的特异性分子靶标，可实现对关键菌株的精准识别与定量分析。加快建立国家级标准菌株资源库和基因组数据库，开放菌株序列比对公共服务，有利于益生菌在菌株层面的定性、定量比对与活性参照。国际上以保质期内活菌数量作为益生菌食品质量的核心指标，但唯有通过胃肠道消化液作用后仍保持活性的益生菌才能真正发挥益生功能，目前针对益生菌食品消化道耐受性和粘附性的检测标准尚未完善。定期对益生菌食品进行微生物纯度检测（包括病原菌污染筛查）、效力检测，以及遵循良好生产规范（Good Manufacturing Practices，GMP）原则，这些都是质量管理的基石。此外，还需要开展更多的临床研究，以支持益生菌的功效声明。

展望未来，以技术创新为驱动力，加速构建标准化检测体系，与国际标准接轨，实现国内外益生菌食品质量安全检测报告的可复制性，与 EFSA/FDA 合作，共享 GRAS/QPS 评估数据，健全数据互认机制。同时，强化中国在国际标准制定领域的参与度与话语权，推动中国标准的国际化进程，助力益生菌食品产业在全球范围内实现规范化、协同化发展。在人工智能时代，智能分析技术将通过多技术协同融合的创新应用模式，逐步构建包含测序平台、生信分析平台、多组学整合分析平台、体外类器官与细胞验证平台以及人工智能（AI）预测模型等在内的技术矩阵。在此基础上，进一步构建科学化、系统化的“质量-安全-功能”三维评价体系，通过多平台数据联动与交叉验证机制，运用“组合拳式”的检测策略，推动益生菌食品检测技术从单一指标检测向全链条质控体系升级，这不仅将净化市场环境，更可助力中国益生菌产业从“规模领先”迈向“技术主导”的全球竞争力新阶段。

参考文献

[1] FAO/WHO. Probiotics in food: health and nutritional propertiesand guidelines for evaluation [M]. Room: FAO/WHO, 2006.

[2] 赵佳,沈馨,刘红霞,等.益生菌缓解亚健康相关症状的研究进展[J].中国食品学报,2024,24(12):432-440.

[3] WANG H Y, LI L. Comprehensive evaluation of probiotic property, hypoglycemic ability and antioxidant activity of lactic acid bacteria [J]. Foods, 2022, 11(9): 1363.

[4] HSING C W, RONG H Y, LI W L, et al. Adjuvant probiotics of *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* AP-32, *L. johnsonii* MH-68, and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CP-9 attenuate glycemic levels and inflammatory cytokines in patients with type 1 diabetes mellitus [J]. Frontiers in Endocrinology, 2022, 13: 754401.

[5] JAHANSHAHI M, MALEKI D P, BADEHHNOOSH B, et al. Anti-tumor activities of probiotics in cervical cancer [J]. Journal of Ovarian Research, 2020, 13(1): 68.

[6] TECHNAVIO. Probiotics market analysis, size, and forecast 2024-2028: North America (US and Canada), Europe (France, Germany, Italy, and UK), Middle East and Africa (Egypt, KSA, Oman, and UAE), APAC (China, India, and Japan), South America (Argentina and Brazil), and rest of world(row) [EB/OL]. (2024-11)[2025-04-23]. https://www.technavio.com/report/probiotics-market-industry-analysis.

[7] 金喆.年轻人开始“花式养生”,益生菌增速最明显[N].每日经济新闻,2025-03-14(008).

[8] DILETTA M, MACRO C, FRANCESCO C, et al. Spotlight on the compositional quality of probiotic formulations marketed worldwide [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 693973.

[9] GOVERNMENT of CANADA. Probiotic blister: out of specification [EB/OL]. (2023-03-01) [2025-04-12]. https://recalls-rappels.canada.ca/en/alert-recall/probiotic-blister-out-specification.

[10] 进出口食品安全局.2021 年 11 月全国未准入境食品化妆品信息[EB/OL].(2021-12-20)[2025-04-23].http://jckspj.customs.gov.cn/spj/xxfw39/fxyj47/4677516/4071885/2021122010003713974.pdf.

[11] VALLABHANENI S, WALKER T A, LOCKHART S R, et al. Notes from the field: fatal gastrointestinal mucormycosis in a premature infant associated with a contaminated dietary supplement-connecticut, 2014 [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2015, 64(6):

155-156.

[12] EFSA. Introduction of a qualified presumption of safety(QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA-opinion of the scientific committee [J]. EFSA Journal, 2007, 587: 1-16.

[13] 方荣,覃先武,陈晖,等.美国 GRAS（“公认安全”）自愿性通告法规浅析及对我国“三新食品”申报的启示[J].中国食品添加剂,2021,32(10):169-178.

[14] ARORA M, BALDI A. Regulatory categories of probiotics across the globe: a review representing existing and recommended categorization [J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2015, 33(5): 2-10.

[15] ROE L A, BOYTE M E, ELKINS A C, et al. Considerations for determining safety of probiotics: a USP perspective [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2022, 136: 105266.

[16] FSSAI. Direction under section 16(5) of the Food Safety and Standards Act, 2006 regarding operationalization of FSS (health supplements, nutraceuticals, foodfor special dietary use, food for special medical purpose and prebiotic and probiotic food) regulations, 2022 [EB/OL]. (2022-03-29)[2025-07-13]. https://fssai.gov.in/upload/advisories/2022/03/6243ef28079ceDirection_Nutra_30_03_2022.pdf.

[17] FIL-IDF. Bulletin of the IDF N 514/2022: inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products [EB/OL]. (2022)[2025-07-14].https://shop.fil-idf.org/products/bulletin-of-the-idf-n-514-2022-inventory-of-microbial-food-cultures-with-safety-demonstration-in-fermented-food-products.

[18] 国家卫生健康委员会.解读《关于阿拉伯木聚糖等 8 种“三新食品”的公告》(2024 年第 3 号)[EB/OL].(2024-08-05)[2025-04-23]. https://zwfw.nhc.gov.cn/kzx/tzgg/sptjjxpzsp_224/202408/t20240828_2906.html.

[19] BINDA S, HILL C, JOHANSEN E, et al. Criteria to qualify microorganisms as "probiotic" in foods and dietary supplements [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11:1662.

[20] MINISTERO DELLA SALUTE. Guidelines on probiotics and prebiotics [EB/OL]. (2018)[2025-04-09]. https://www.salute.gov.it/new/sites/default/files/imported/C_17_pubblicazioni_1016_ulterioriallegati_ulteriореallegato_0_alleg.pdf.

[21] GOVERNMENT of CANADA. Health claims about microorganisms and use of the term "probiotic"[EB/OL]. (2024-12-23)[2025-04-23]. https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-labelling/health-claims/microorganisms-term-probiotic.html.

[22] ANVISALEGIS. Instrução normativa-IN n 284, de 07/03/2024[EB/OL]. (2024-3-7)[2025-04-13].https://anvisalegis.datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&tipo=INM&numeroAto=00000284&seqAto=000&valorAno=2024&orgao=DC/ANVISA/MS&codTipo=&desItem=&desItemFim=&cod_menu=1696&cod_modulo=134&pesquisa=true.

[23] PRESIDENCIA DE LA NACIÓNREPÚBLICA ARGENTINA. Boletin oficial republica argentina-secretaría de agricultura, ganadería ypesca y secretaría de calidad en salud-resolución conjunta 32/2023[EB/OL]. (2023-11-29)[2025-04-13].https://www. boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/299624/20231201.

[24] WORLD TRADE ORGANIZATION. Notification-Thailand-probiotic as food component [EB/OL]. (2010-11-15)[2025-04-13]. https://docs.wto.org/dol2fe/Pages/SS/directdoc.aspx?filename=Q:/G/Tbtn10/THA356.pdf&Open=True.

[25] CXS 243-2003(amended in 2024), Standard for fermented milks[S].

[26] 国家食品药品监督管理局.益生菌类保健食品申报与审评规定(试行):国食药监注[2005]202 号[Z].2005.

[27] GB 19302-2025,食品安全国家标准 发酵乳[S].

[28] GB 7101-2022,食品安全国家标准 饮料[S].

[29] GB 10765-2021,食品安全国家标准 婴儿配方食品[S].

[30] GB 10767-2021,食品安全国家标准 幼儿配方食品[S].

[31] GB 10769-2025,食品安全国家标准 婴幼儿谷类辅助食品[S].

[32] GB 25596-2025,食品安全国家标准 特殊医学用途婴儿配方食品通则[S].

[33] GB 29922-2013,食品安全国家标准 特殊医学用途配方食品通则[S].

[34] GB/T 21732-2008,含乳饮料[S].

[35] DB43/T 2903-2024,益生菌及其制品生产技术规范[S].

[36] QB/T 5940-2024,凝结魏茨曼氏菌菌粉[S].

[37] QB/T 4575-2023,食品用菌种制剂[S].

[38] T/CHC 1014-2024,益生菌制剂食品[S].

[39] T/CIFST 009-2022,食品用益生菌通则[S].

[40] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020.

[41] 刘洋,窦同海,陈雯雯.16S rRNA 和 MLST 在配方乳粉双歧杆菌分类中的应用[J].食品工业,2017,38(5):213-217.

[42] SABAT A J, BUDIMIR A, NASHEV D, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance [J]. Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles=European Communicable Disease Bulletin, 2013, 18(4): 20380.

[43] GOERING V R. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2010, 10(7): 866-875.

[44] 王营,张晟,孟祥晨.基于 PFGE 技术的酸乳中乳酸菌的基因分型[J].乳业科学与技术,2018,41(1):22-25.

[45] 吴雨辰,胡燕燕,张嵘.细菌分型方法的研究进展[J].中国感染与化疗杂志,2021,21(5):617-623.

[46] RAMADAN A A. Bacterial typing methods from past to present: a comprehensive overview [J]. Gene Reports, 2022, 29: 101675.

[47] 胡燕玲,陈亚波,殷欢,等.食品中双歧杆菌检验及鉴定方法研究[J].现代农业科技,2021,50(12):227-229.

[48] HERBEL S R, VAHJEN W, WIELER L H, et al. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus* [J]. Gut Pathogens, 2013, 5(1): 27.

[49] JAROCKI P, KOMOŃ-JANCZARA E, GLIBOWSKA A, et al. Molecular routes to specific identification of the *Lactobacillus casei* group at the species, subspecies and strain level [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(8): 2694-2694.

[50] LANINI S, D'AREZZO S, PURO V, et al. Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser [J]. Plos One, 2011, 6: e17064.

[51] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 5-7.

[52] 万文渊,张丰,刘志勇,等.CRISPR-Cas 检测系统在食品供应链中安全防控的应用研究进展[J].粮油食品科技,2025,33(4):141-147.

[53] GONG J, JIANG Y, ZHANG D, et al. One-tube detection of *Salmonella typhimurium* using LAMP and CRISPR-Cas12b [J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(10): e0127124.

[54] 王也,凌志婷,徐尧,等.单核细胞增生李斯特菌基于基因组学的分型和溯源技术研究[J].中国人兽共患病学报,2022,38(4):327-330+340.

[55] REVEZ J, ESPINOSA L, ALBIGER B, et al. Survey on the use of whole-genome sequencing for infectious diseases surveillance: rapid expansion of European national capacities, 2015-2016 [J]. Frontiers in Public Health, 2017, 5: 347.

[56] SONG Z, GE Y, YU X, et al. Development of a single nucleotide polymorphism-based strain-identified method for *Streptococcus thermophilus* CICC 6038 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CICC 6047 using pan-genomics analysis [J]. J Dairy Sci, 2024, 107(7): 4248-4258.

[57] BESSER J, CARLETON H, GERNER-SMIDT P, et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2018, 24(4): 335-341.

[58] SHEN H, XIE J, GAO W, et al. Detection limit of FT-IR-based bacterial typing based on optimized sample preparation and typing model [J]. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, 2024, 307: 123633.

[59] 范铁男,邹积宏,卢行安,等.基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术作为常见益生菌菌种鉴定辅助工具的研究[J].中国微生态学杂志,2010,22(11):970-973.

[60] DEIDDA F, CIONCI N B, CORDOVANA M, et al. *Bifidobacteria* strain typing by fourier transform infrared spectroscopy [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 692975.

[61] SHANG L, WANG Y, CHEN F, et al. Ultra-fast identification of lactic acid bacteria colonies based on droplet microcavity label-free SERS [J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 204: 116435.

[62] 石吉勇,张芳,胡雪桃,等.基于高光谱技术的乳杆菌快速鉴别[J].中国食品学报, 2018,18(8):208-213.

[63] PRIETO A C, FERNÁNDEZ L, GONZÁLVEZ R P, et al. Advances in the detection and identification of bacterial biofilms through NIR spectroscopy [J]. Foods, 2025, 14(6): 913-913.

[64] 王芳,仇大剑,夏红岩,等.太赫兹时域光谱技术在识别鉴定菌制剂中的初探[J].红外与激光工程,2016,45(7):81-87.

[65] ISO 9232:2003, Yogurt-Identification of characteristic microorganisms(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus*

thermophilus)[S].

[66] USP. Monographs supplement, 12th ed[S].

[67] FDA. Bacteriological analytical manual (BAM)[EB/OL]. (2024-12-12)[2025-07-21].https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam.

[68] Bulletin of the lDF N ℃513/2021: identifcation of probiotics at the strain level- guidance document[S].

[69] GB 4789.35-2023,食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].

[70] GB 4789.34-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌检验[S]

[71] GB/T 34224-2017,生物产品中功能性微生物检测[S].

[72] GB/T 33682-2017,基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则[S].

[73] QB/T 5165-2017,食品用乳酸菌鉴定技术指南[S].

[74] T/CITS 257-2025,微生物快速鉴定 质谱法[S].

[75] T/SSFS 0012-2024,食品中马克斯克鲁维酵母的定性检验 PCR 法[S].

[76] T/CAAPP 00011-2021,食品微生物学检验 食品用乳酸菌菌株鉴定方法[S].

[77] T/SZAS 22-2020,基于全基因组测序的益生菌菌株分型鉴定指南[S].

[78] T/CALAS 92-2020,实验动物 木糖葡萄球菌检测方法[S].

[79] GB 31615.2-2025,食品安全国家标准 食品用菌种安全性评价程序[S].

[80] 国家市场监督管理总局.关于发布《保健食品及其原料安全性毒理学检验与评价技术指导原则(2020 年版)》《保健食品原料用菌种安全性检验与评价技术指导原则(2020 年版)》《保健食品理化及卫生指标检验与评价技术指导原则(2020 年版)》[EB/OL]. (2020-10-31)[2025-04-23]. https://www.samr.gov.cn/cms_files/filemanager/1647978232/attach/20233/W020210819303152966736.doc.

[81] FEEDAP. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance [J]. EFSA Journal, 2012, 10(6): 2740.

[82] 席杨,梁媛媛,孙丽萍,等.益生菌的耐药性及其安全性的研究进展[J].食品安全导刊, 2024, 18(23): 172-177+181.

[83] FDA. Advancing Alternative Methods at FDA [EB/OL]. (2023-11-14)[2025-04-12]. https://www.fda.gov/science-research/about-science-research-fda/advancing-alternative-methods-fda.

[84] BESSELINKI M G H, VAN S H C, BUSKENS E, et al. Probiotic prophylaxis in predicted severe acutepanereatitis: a randomised, double-bind, placebo-controlled tial [J]. The Lancet, 2008, 371(9613): 651-659.

[85] DAVIDSON S J, BARRETT H L, PRICE S A, et al. Probiotics for preventing gestational diabetes [J]. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2021, 4(4): CD009951.

[86] DANIEL M, BRUNO P, GREGORY L, et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives [J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2185034.

[87] PRADHAN D, SINGH R, TYAGI A, et al. Assessing safety of *Lactobacillus plantarum* MTCC 5690 and *Lactobacillus fermentum* MTCC 5689 using *in vitro* approaches and an *in vivo* murine model [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2019, 101: 1-11.

[88] VANKERCKHOVEN V, HUYS G, VANCANNEYT M, et al. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project [J]. Trends in Food Science & Technology, 2008, 19(2): 102-114.

[89] PRADHAN D, MALLAPPA H R, GROVER S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria [J]. Food Control, 2020, 108: 106872.

[90] ANDREA G L, GIULIA L, GIULIA A, et al. The probiotic identity card: a novel “probiogenomics” approach to investigate probiotic supplements [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 790881.

[91] MICHELUTTI L, BULFONI M, NENCIONI E. A novel pharmaceutical approach for the analytical validation of probiotic bacterial count by flow cytometry [J]. Journal of Microbiological Methods, 2020, 170: 105834.

[92] MAROLE T A, SIBANDA T, BUYS E M. Assessing probiotic viability in mixed species yogurt using a novel propidium monoazide (PMAxx)-quantitative PCR method [J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1325268.

[93] ZHAO S, LU X, ZHANG J, et al. Absolute quantification of viable but nonculturable vibrio cholerae using droplet digital PCR with oil-enveloped bacterial cells [J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): 0070422.

[94] WANG P, LIANG L, PENG X, et al. Sodium deoxycholate-propidium monoazide droplet digital PCR for rapid and quantitative detection

of viable *Lacticaseibacillus rhamnosus* HN001 in compound probiotic products [J]. Microorganisms, 2024, 12(8): 1504-1504.

[95] 赵磊,刘洋,凌李维,等.发酵乳中活性益生菌三重数字 PCR 定量检测方法的建立[J].中国乳品工业,2025,53(1):73-80.

[96] KIM M J, SHIN S W, KIM H B, et al. Direct loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid on-site detection of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum*, *infantis*, and *suis* in probiotic products [J]. Food Chemistry, 2020, 346: 128887.

[97] 庄翘楚,孟祥晨.双抗夹心 ELISA 法检测双歧杆菌反应条件的优化[J].中国乳品工业,2008,36(5):55-58.

[98] WU H, WU Q, ZHANG J, et al. Study on rapid quantitative detection of total bacterial counts by the ATP-bioluminescence and application in probiotic products [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46(5): 921-929.

[99] WU H, LIU S, LI M, et al. Isolation and purification of lactic acid bacteria and yeasts based on a multi-channel magnetic flow device and rapid qualitative and quantitative detection [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2025, 327: 125296.

[100] BODOR Z, ZAUKUU J L Z, KASZAB T, et al. Monitoring *Lactobacillus bulgaricus* growth in yoghurt by electrical impedance [J]. IFMBE Proceedings, 2020, 72: 158-165.

[101] 周立光,杨明喆,冯会粉,等.复合益生菌产品菌种鉴定及活菌定量检测方法[J].食品与发酵工业,2022,48(9):235-244.

[102] 徐帅,郝琴,代艳发,等.LAMP 法与 PCR 法在食品动物源性成分检测中的应用[J].中国食物与营养,2020,26(10):20-23.

[103] LI L, WANG T, ZHONG Y, et al. A review of nanomaterials for biosensing applications [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2024, 12(5): 1168-1193.

[104] AWLQADR H F, ALTEMIMI B A, QADIR A S, et al. Emerging trends in nano-sensors: a new frontier in food safety and quality assurance [J]. Heliyon, 2025, 11(1): e41181.

[105] JIA M, LIU J, ZHANG J, et al. An immunofiltration strip method based on the photothermal effect of gold nanoparticles for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Analyst, 2019, 144(2): 573-578.

[106] WU W, LI J, PAN D, et al. Gold nanoparticle-based enzyme-linked antibody-aptamer sandwich assay for detection of *Salmonella Typhimurium* [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, 6(19): 16974-16981.

[107] ISO 29981:2024, Milk products-enumeration of bifidobacteria-colony-count technique[S].

[108] ISO 22174:2024, Microbiology of the food chain-polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms-general requirements and definitions[S].

[109] ISO 19344:2015, Milk and milk products-starter cultures, probiotics and fermented products-quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry[S].

[110] ISO 22118:2011, Microbiology of food and animal feeding stuffs-polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens- performance characteristics[S].

[111] ISO 20128:2006, Milk products-enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium-colony-count technique at 37 degrees C[S].

[112] ISO 7889:2003, Yogurt-enumeration of characteristic microorganisms-colony-count technique at 37 degrees C[S].

[113] ISO 15214:1998, Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria-colony-count technique at 30 degrees C[S].

[114] USP. General tests and assays: probiotic tests <64>. In USP42-NF37, first supplement[S]

[115] Russian pharmacopoeia(Ph. Ru.) general pharmacopoeial monograph. GPhM.1.7.2.0009.15 the determination of probiotics specific activity, 13th ed[S].

[116] QB/T 5949-2023,凝结魏茨曼氏菌计数方法[S].

[117] SN/T 5642.1~7-2023,出口乳制品中乳酸菌检测方法 数字 PCR 计数法[S].

[118] SN/T 5451-2022,商品化试剂盒检测方法乳酸菌总数 方法一[S].

[119] SN/T 5436-2022,乳及乳制品发酵剂、发酵产品中乳酸菌计数 流式细胞仪法[S].

[120] T/CIFST 020-2024,食品用菌种检验 鼠李糖乳酪杆菌检验 PMA-qPCR 法[S].

[121] AZHAR A M, MUNAIM A S M, HASAN M, et al. Viability and gastrointestinal tolerance of commercial probiotic products[J]. International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences, 2020, 9(3): 117-121.

[122] T/CNHFA 435-2024,益生菌剂胃液耐受性检验方法[S].

[123] ILKAY S. A review on the food digestion in the digestive tract and the used *in vitro* models [J]. Current Research in Food Science, 2021, 4(004): 308-319.

[124] PEREIRA M D V G, COELHO O D B, JÚNIOR M I A, et al. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria [J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(8): 2060-2076.

[125] AYYASH M, ABDALLA A K, ALKALBANI N S, et al. Invited review: characterization of new probiotics from dairy and nondairy products-Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(8): 8363-8379.

[126] AYYASH M, ABUSHELAIBI A, AL-MAHADIN S, et al. *In-vitro* investigation into probiotic characterisation of *Streptococcus* and *Enterococcus* isolated from camel milk [J]. LWT- Food Science and Technology, 2018, 87: 478-487.

[127] AYYASH M, ABDALLA A K, ALKALBANI N S, et al. Supplementary tables [EB/OL]. (2021-04-06)[2025-07-13].https://data.mendeley.com/datasets/bz664zn5g9/1.

[128] 国家市场监督管理总局.关于发布《允许保健食品声称的保健功能目录 非营养素补充剂（2023 年版）》及配套文件的公告[EB/OL]. (2023-08-15)[2025-07-21].https://www.samr.gov.cn/cms_files/filemanager/1647978232/attach/20239/aa24a5ebf5e24f488b1cb0abef8f1332.pdf?fileName=%E3%80%8A%E4%BF%9D%E5%81%A5%E9%A3%9F%E5%93%81%E5%8A%9F%E8%83%BD%E6%A3%80%E9%AA%8C%E4%B8%8E%E8%AF%84%E4%BB%B7%E6%96%B9%E6%B3%95%EF%BC%882023%E5%B9%B4%E7%89%88%EF%BC%89%E3%80%8B.pdf.

[129] MATSUMOTO K, TAKADA T, SHIMIZU K, et al. Effects of a probiotic fermented milk beverage containing *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on defecation frequency, intestinal microbiota, and the intestinal environment of healthy individuals with soft stools [J]. J Biosci Bioeng, 2010, 110(5): 547-552.

[130] TURKMEN N, AKAL C, ÖZER B. Probiotic dairy-based beverages: a review [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 53: 62-75.

[131] PATIL A, SINGH N, PATWEKAR M, et al. AI-driven insights into the microbiota: figuring out the mysterious world of the gut [J]. Intelligent Pharmacy, 2025, 3(1): 46-52.

[132] SUN Y, LI H C, ZHENG L, et al. iPrbiotics: amachine leaming platform for rapid identification ofprobiotic properties from whole-genome primary sequences [J]. Brief Bioinform, 2022, 23(1): bbab477.

[133] KARAKAN T, GUNDOGDU A, ALAGÖZLÜ H, et al. Artificial intelligence-based personalized diet: a pilot clinical study for irritable bowel syndrome [J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2138672.

[134] VULPOI RA, LUCA M, CIOBANU A, et al. The potential use of artificial intelligence in irritable bowel syndrome management [J]. Diagnostics (Basel), 2023, 13(21): 3336.