

# 《益生菌剂胃液耐受性评价方法》

## 编制说明

# 团体标准《益生菌剂胃液耐受性评价方法》编制说明

## 一、工作简况，包括任务来源、协作单位、主要工作过程、标准起草单位及人员

### 1 任务来源

2023 年 1 月 4 日，中国营养保健食品协会发布《中国营养保健食品协会团体标准立项公告 2023 年第 1 号（总第 15 号）》公告，将本任务列入团体标准制定工作计划，计划下达项目名称为《益生菌剂胃液耐受性评价方法》，由中国营养保健食品协会保健食品研发专业委员会提出，中国营养保健食品协会归口。立项时计划完成时间为 2023 年。

### 2 主要工作过程

#### （1）起草阶段

标准任务下达后，中国食品发酵工业研究院有限公司于 2023 年 1 月开始向行业征集起草单位并组建标准起草工作组，同步征求标准制定建议、企业标准文件及样品等制标所需资料。牵头单位广泛查阅国内外先进标准及文献资料，整理相关技术方法及评价指标，初步形成标准制定技术流程图。

2023 年 2 月 28 日，召开标准制定工作启动会暨第一次工作组会议。

2023 年 3 月，征集益生菌剂样品，整理验证所需益生菌剂样品，

邮寄分发至各比对实验室。

2023年3月-5月，开展标准方法验证实验室比对工作。

2023年3月-6月，开展胃液耐受性关键影响因素研究。

2023年7月-8月，开展样品实验室内及实验室间的样品益生菌剂胃液耐受性评价研究工作。

2023年9月13日，召开中期标准审查会议，并形成团体标准征求意见稿。

## **(2) 征求意见阶段**

暂略。

## **(3) 审查阶段**

暂略。

## **(4) 报批阶段**

暂略。

## **3 主要起草单位和起草人**

本文件由中国营养保健食品协会保健食品研发专业委员会提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

益生菌剂胃液耐受性评价方法使用方所在行业协会：中国营养保健食品协会保健食品研发专业委员会。

起草单位：暂略

起草人：暂略

## **二、标准编制原则和确定标准主要内容**

### **1 标准编制原则**

本标准的制定的主要目的是 1.建立益生菌剂原料和益生菌类食品的胃液耐受性评价方法；2. 为益生菌剂原料和益生菌类食品的质量评价提供技术评价手段。

本标准的制定符合产业发展的原则，本着先进性，科学性，合理性和可操作性的原则，以及标准的目标性，统一性，协调性，适用性，一致性和规范性原则来进行本标准的制定工作。本标准按照 GB/T 1.1-2020 等给出的规则起草。本标准的制定主要依据国家有关法律、法规、国家标准管理办法以及相关标准等，并结合益生菌剂原料和益生菌类食品产品特性，确定本标准的具体评价方法。

### **2 标准主要内容**

本文件规定了益生菌剂在模拟胃液中的耐受性评价方法，其他菌剂可参考本方法执行。本文件适用于粉末状、颗粒状等益生菌剂的胃液耐受性评价。

## **三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果**

### **1 研究报告**

#### **1.1 胃蛋白酶活力测定**

胃蛋白酶（Pepsin），CAS 号 9001-75-6，是人和猪胃中的主要

蛋白酶，能够有助于脊椎动物胃中食物蛋白质的蛋白质水解。本标准在制定过程中参考相关文献，规定了胃蛋白酶活力的测定方法，方法原理为“胃蛋白酶在 37 °C和 pH2.0 条件下，水解血红蛋白底物产生可溶性酪氨酸肽，能溶解于三氯乙酸，用分光光度计于波长 280 nm 处测定溶液的吸光度，酶活力与吸光度成正比”，具体检验结果如图 1 所示。

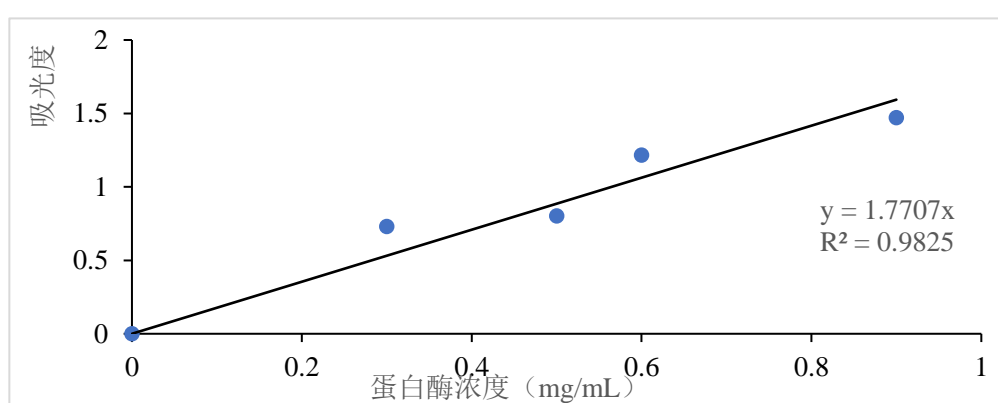


图 1 胃蛋白酶活力测定结果

## 1.2 预实验研究

本标准通过参考 INFOGEST 体外静态模拟消化模型，其中模拟胃液（Simulated Gastric Fluid, SGF）的 pH 值要求为 3.0，对市售 10 款益生菌剂产品开展胃液耐受性评价研究。

图 2 结果表明，在 pH3.0 胃酸条件下，经 2h 模拟胃液处理后，1 号样品依旧保持足够的活菌率，对于 pH3.0 模拟胃液具有很强的耐受性；2-9 号样品的活菌存活率均出现了明显下降，且产品之间具有明显的差异性，证明本方法能够对行业产品的耐受性进行区分。检测过程中对于样品菌液（益生菌剂+稀释液）的 pH 值，样品菌液和模拟胃液混合后的 pH 值进行了测定，分析可见不同产品配置后的样

品菌液 pH 值差异明显，pH 范围在 5.00-7.06；与 pH3.0 模拟胃液混合后 pH 明显下降，变化同样具有明显差异，差异变化范围在 1.18-2.98 之间。表明不同产品辅料的添加，对于模拟胃液 pH 值的缓冲能力具有差异。同时不同产品的原料菌剂存在较大差异，原料菌种的胃液耐受性能力不同，所以不同益生菌剂与模拟胃液混合后，pH 值的变化与试剂胃液耐受性无法达成一致规律。

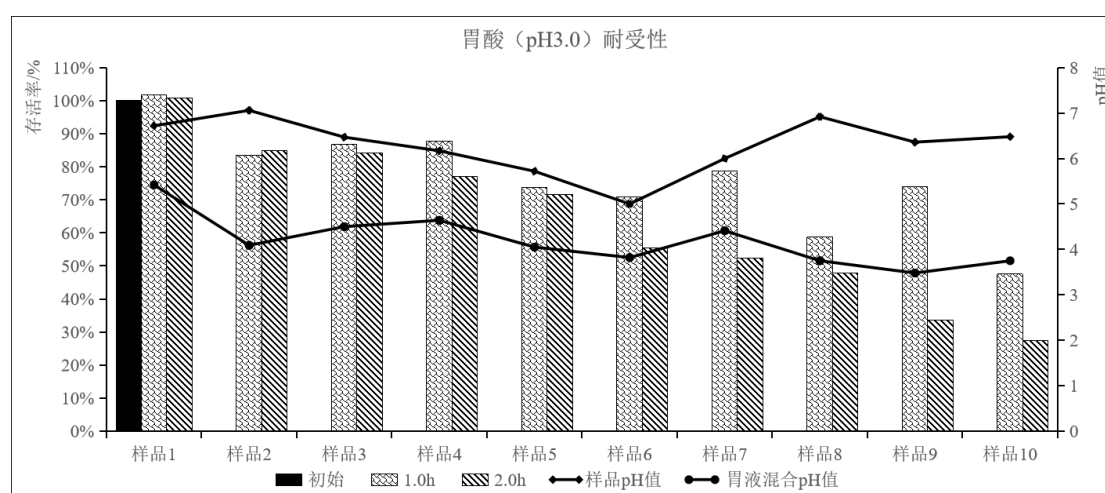


图 2 10 款益生菌剂在 pH3.0 胃液耐受性研究

## 1.3 单一因素研究

### 1.3.1 胃蛋白酶活力

胃蛋白酶作为人体胃部环境中一种重要的酶，国内外大多数的研究文献在配置模拟胃液时均需要添加一定量的胃蛋白酶，相关调研结果如图 3 所示，其中添加量范围主要集中在 0-10g/L。通过调研目前市售胃蛋白酶的试剂产品，不同厂家不同型号产品的胃蛋白酶活力具有很大区别，若是按照胃蛋白酶的质量规定并配置模拟胃液，不利于胃液耐受性评价方法的标准化，会影响益生菌剂耐受性的评

价结果。

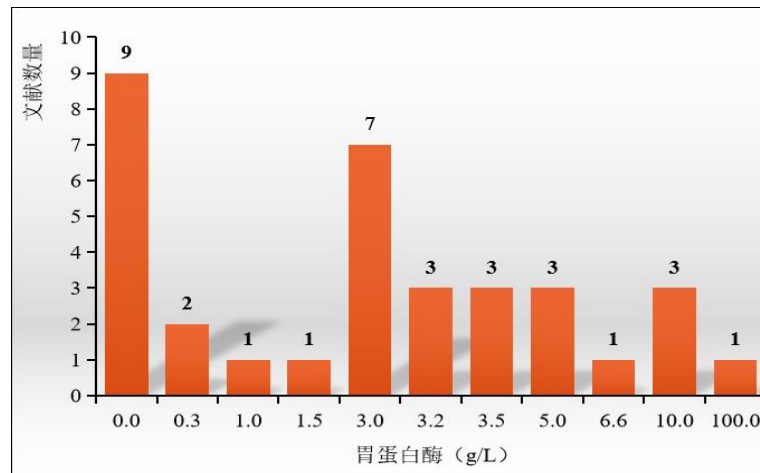


图3 相关研究文献中模拟胃液胃蛋白酶添加量

**INFOGEST** 模型研究中，对于模拟胃液中胃蛋白酶添加量规定为 **2000U/mL**，明确酶活力添加量能够规范模拟胃液的配制以及提高方法的可操作性。上述文献调研结果证明，模拟胃液配置过程中有部分文献未添加胃蛋白酶，本标准方法在制定过程中，按酶活力 **2000U/mL** 及 **0U/mL** 添加设置对照实验，实验结果表明不同胃蛋白酶添加量对 **CP1**、**CP2** 两种样品的胃液耐受性评价结果出现了明显差异，证明在模拟胃液中添加胃蛋白酶能够影响益生菌剂的耐受性评价结果。

### 1.3.2 模拟肠蠕动

人体正常摄入饮食后，胃部能够通过蠕动促进食物与胃液充分混合，加快食物的消化过程，本标准方法目的是建立一种静态模拟胃部环境的耐受性评价方法，参考相关体外评价研究文献，在模拟胃部消化过程中一般采用摇床震荡形式，选用的摇床转速条件为 **0-200r/min**，相关调研结果如图4所示。

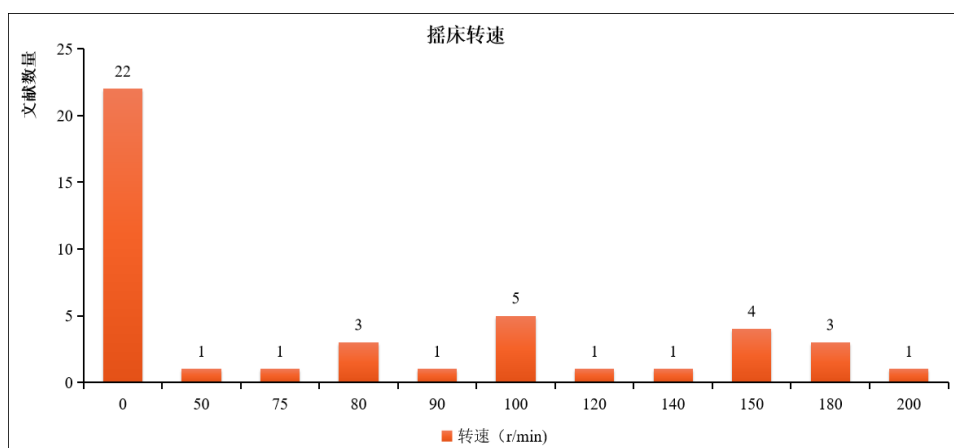


图 4 相关研究文献中摇床转速

INFOGEST 模型研究中，对于模拟胃部消化过程同样采用了摇床震荡形式，但是未规定摇床转速。上述调研结果证明，模拟胃部消化过程中多数研究是采用静置培养，采用摇床震荡培养的实验条件多为 100-200r/min。通过预实验表明，采用 100r/min 的摇床震荡培养能够有效是菌剂和模拟胃液进行混合，也是研究文献中采用最多的实验条件，故本标准方法在制定过程中，按摇床转速 100r/min 及 0r/min 设置对照实验，实验结果表明不同摇床转速条件对 CP1、CP2 两种样品的胃液耐受性评价结果均出现了明显差异，证明在模拟胃部消化过程中应进行摇床震荡培养，利于有效分析益生菌剂的胃液耐受性效果。

#### 1.4 关键指标因素控制

本标准方法的核心内容是模拟胃液的配置，其中涉及电解质溶液 A 和电解质溶液 B 的配置，以及模拟胃液 pH 值的调节，上述技术内容的稳定性会影响益生菌剂的耐受性评价结果。5 家比对实验室利用统一分发的 pH 标准校准溶液对各自实验室 pH 计进行校准，并测定 PBS 缓冲液的 pH 值用于质控 pH 计设备是否能够正常使用，测



定实验用去离子水和灭菌后的电解质溶液 B 的 pH 值，结果表明 pH 计和实验用试剂各实验室间的测定结果无明显差异，其中 PBS 缓冲液、去离子水和电解质溶液（灭菌后）的测定结果 RSD 值分别为 0.85%、4.05%和 5.84%，见图 5。

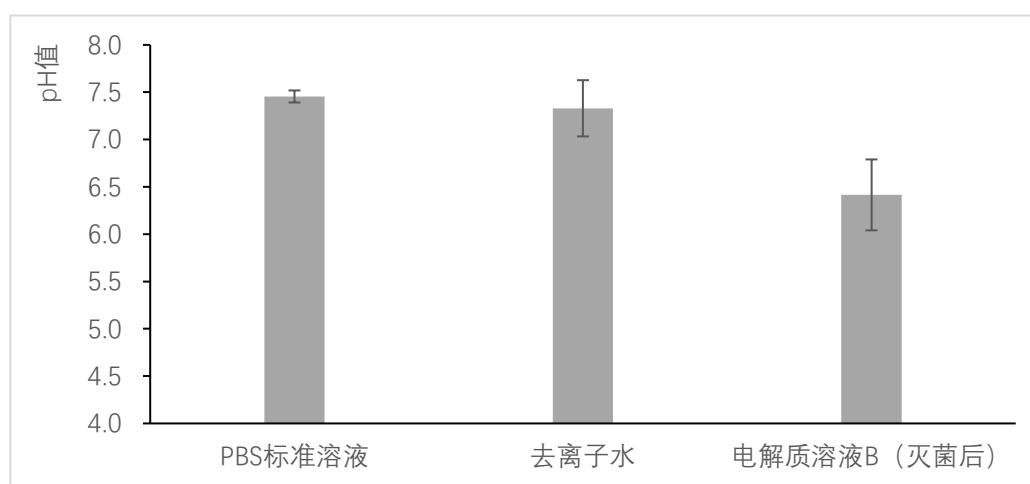


图 5 pH 计及试剂溶液 pH 值质量控制

## 1.5 方法建立验证

本标准方法原理是通过检验初始时刻（0h）的益生菌剂活菌总数，记为 N，再将其经过模拟胃液处理 2h 后测定其活菌总数，记为 N'，再计算经 2h 模拟胃液处理后的胃液耐受性，用百分率形式表示。对于微生物活菌总数检验一般常采用稀释倾注平板法进行分析，此方法具有简单、易重复、费用低的优点，目前已经作为微生物检验计数方法的金标准，但是此方法本身同样具有易引起人员操作误差、耗时长的缺点，故本评价方法在建立过程中规定在进行耐受性评价时，同时安排 2 人完成 3 组平行实验，并对活菌计数结果进行统计学分析，进而计算益生菌剂胃液耐受性。

如下图 6-7 所示实验结果，组织不同人员开展胃液耐受性评价，

针对每位实验人员日间操作的初始时刻益生菌活菌计数结果和胃液耐受处理后益生菌活菌计数结果，分析同一数据组内相对标准偏差，相对标准偏差不大于 30%，数据有效，能够进行耐受性分析。

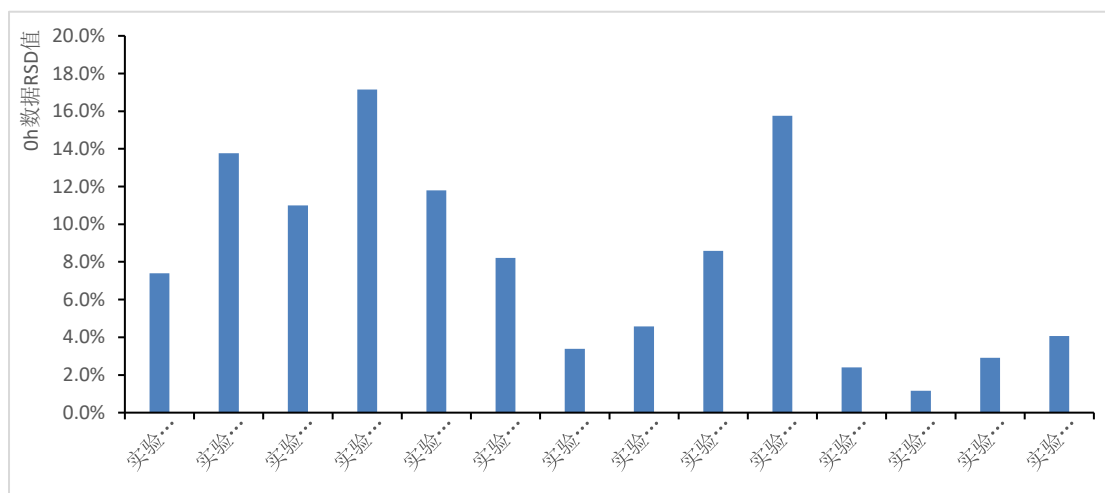


图 6 0h 活菌计数结果相对标准偏差

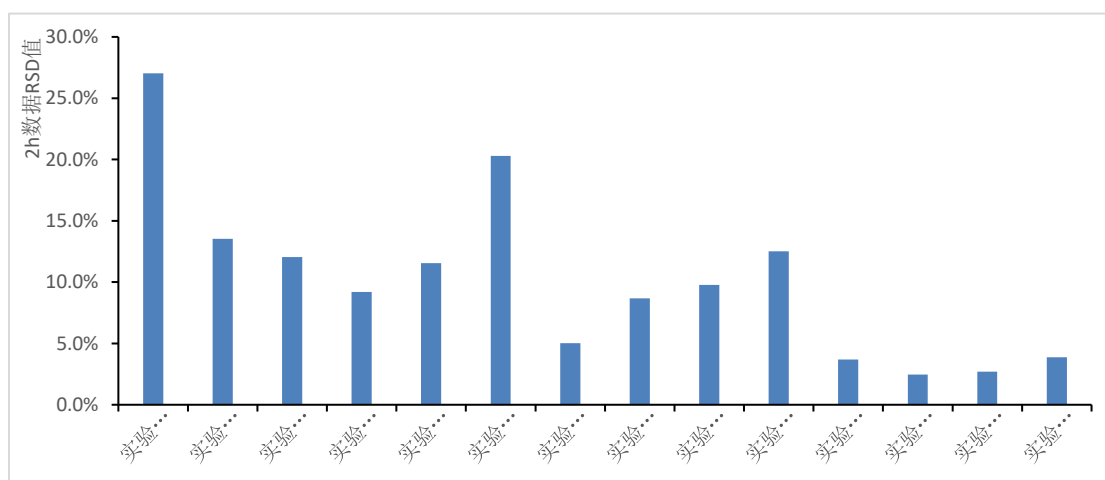


图 7 2h 活菌计数结果相对标准偏差

## 2 预期的经济与社会效果

为保证益生菌剂胃液耐受性评价方法建立的科学性、严谨性，标准将对试验方法全流程以及关键环节进行验证研究，其中包括不限于：胃酸 pH 值、胃蛋白酶、消化时间、电解质等因素。益生菌剂

胃液耐受性评价方法在发布后期望能下下述环节进行应用，包括：

1. 有助于益生菌类保健食品新产品开发和创新；
2. 应用于益生菌原料和益生菌类食品上市后质量评价；
3. 有助于行业对高质量益生菌菌株的筛选及研发工作。

#### **四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际同类标准水平的对比情况**

未发现其他国家、地区存在益生菌剂胃液耐受性评价方法相关标准。

本标准为首创标准。

#### **五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系**

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

#### **六、重大分歧意见的处理经过和依据**

本标准未产生重大分歧意见。

#### **七、作为强制性标准或推荐性标准的建议**

本标准可作为团体标准，团体内成员自愿采用。

#### **八、贯彻标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法、实施日期等内容）**

本标准为首次发布。

## 九、 其他需要说明的事项

无其他需要说明的事项