



410653S-2025



郑州和合生物工程技术有限公司企业标准

Q/ZHS 0004S-2025

益生菌复合粉

2025-03-05 发布

2025-03-05 实施

郑州和合生物工程技术有限公司 发布

前 言

本标准中的附录 A、B、C、D、E 为规范性附录。

本标准由郑州和合生物工程技术有限公司提出并起草。

本标准主要起草人：丁一、李晓。

本标准替代 Q/ZHS 0004S-2022。

H N

Q B

益生菌复合粉

1 范围

本标准规定了益生菌复合粉的分类、要求、检验方法、检验规则等。

本标准适用于以青春双歧杆菌、动物双歧杆菌动物亚种、动物双歧杆菌乳亚种、两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、长双歧杆菌长亚种、长双歧杆菌婴儿亚种、嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、德氏乳杆菌乳亚种、格氏乳杆菌、瑞士乳杆菌、约氏乳杆菌、马乳酒样乳杆菌马乳酒样亚种、干酪乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌、鼠李糖乳酪杆菌、发酵粘液乳杆菌、罗伊氏粘液乳杆菌、植物乳植杆菌、唾液联合乳杆菌、弯曲广布乳杆菌、清酒广布乳杆菌、唾液链球菌嗜热亚种、乳酸乳球菌乳亚种、乳酸乳球菌乳亚种（双乙酰型）、乳脂乳球菌、费氏丙酸杆菌谢氏亚种、产丙酸丙酸菌、肠膜明串珠菌肠膜亚种、乳酸片球菌、戊糖片球菌、凝结魏茨曼氏菌、小牛动物球菌、木糖葡萄球菌、肉葡萄球菌、马克斯克鲁维酵母中的一种或多种为菌种，选取水、食用葡萄糖、乳糖、白砂糖、牛骨蛋白胨、酵母浸膏、酵母浸粉、牛肉浸粉、大豆蛋白胨、鱼蛋白胨中的多种原料配制发酵培养基，经接种、发酵[食品加工助剂（吐温 80、乙酸钠、硫酸镁）]、浓缩（或不浓缩）、离心（或不离心）、乳化（或不乳化）、冻干、粉碎制成益生菌粉，再添加乳粉、乳清粉、乳清蛋白粉、胶原蛋白肽、水解胶原蛋白、速溶豆粉、大豆肽粉、海洋鱼低聚肽粉、红糖粉、黑糖粉、麦芽糊精、抗性糊精、小麦低聚肽粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉、菊粉、低聚果糖、低聚木糖、低聚异麦芽糖、大豆低聚糖、水苏糖、低聚甘露糖、聚葡萄糖、可可粉、咖啡粉、果蔬粉（山药、胡萝卜、南瓜、黄瓜、黄秋葵、苦瓜、木瓜、红枣、苹果、山楂、草莓、芒果、蓝莓、西柚、百香果、橙子、沙棘、香蕉、水蜜桃、荔枝、蔓越莓、桑葚、猕猴桃、圣女果、樱桃、西瓜、哈密瓜、火龙果、石榴、梨、青梅、柠檬、金桔、桂圆、牛油果、葡萄、菠萝、枸杞、枇杷、黑果枸杞、菊芋中的一种或几种）、钝顶螺旋藻、玫瑰茄、人参（人工种植 5 年及 5 年以下）或提取物、葛根提取物、罗汉果提取物、塔格糖、奇亚籽、酵母 β -葡聚糖、雪莲培养物、磷脂酰丝氨酸、植物甾醇、雨生红球藻、DHA 藻油、鱼油及提取物、圆苞车前子壳、异麦芽酮糖醇、L-阿拉伯糖、玉米低聚肽粉、裸藻、壳寡糖、阿拉伯半乳聚糖、马铃薯提取物、燕麦 β -葡聚糖、白芸豆提取物、海藻糖、针叶樱桃果粉、植物甾醇酯、甘油二酯油、乳矿物盐、花生四烯酸油脂、中长链脂肪酸食用油、蔗糖聚酯、茶树花、磷虾油、蛹虫草、桃胶、酵母蛋白、杜仲籽油、茶叶籽油、棉籽低聚糖、表没食子儿茶素没食子酸酯、桑叶提取物、酵母抽提物、食用盐、魔芋粉中的一种或几种，加入或不加入果胶、瓜尔胶、羟丙基二淀粉磷酸酯、黄原胶、羧甲基纤维素钠、食品用香精、食品加工用酵母、木糖醇、赤藓糖醇、罗汉果甜苷、柠檬酸、L-苹果酸中的一种或几种，经混合、制粒或不制粒、灭菌或不灭菌、包装制成的益生菌复合粉。

2 产品分类

2.1 根据使用菌株种类不同可分为：添加一种菌株的单菌型，添加两种及以上菌株的复合型；

2.2 根据产品用途可分为以下几种类型：用于生产加工的为加工型益生菌产品；用于食品工业发酵或家庭发酵的为发酵型益生菌产品；提供给消费者直接食用的为即食型益生菌产品。

2.3 根据形态不同可分为颗粒型和粉末型。

2.4 根据工艺是否进行灭菌处理，分为活菌型和灭菌型（或灭活型、杀菌型）。

3 要求

3.1 原辅料要求

3.1.1 生产用水应符合 GB 5749 的规定。

3.1.2 青春双歧杆菌、动物双歧杆菌动物亚种、动物双歧杆菌乳亚种、两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、长双歧杆菌长亚种、长双歧杆菌婴儿亚种、嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、德氏乳杆菌乳亚种、格氏乳杆菌、瑞士乳杆菌、约氏乳杆菌、马乳酒样乳杆菌马乳酒样亚种、干酪乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌、鼠李糖乳酪杆菌、发酵粘液乳杆菌、罗伊氏粘液乳杆菌、植物乳植杆菌、唾液联合乳杆菌、弯曲广布乳杆菌、清酒广布乳杆菌、唾液链球菌嗜热亚种、乳酸乳球菌乳亚种、乳酸乳球菌乳亚种（双乙酰型）、乳脂乳球菌、费氏丙酸杆菌谢氏亚种、产丙酸丙酸菌、肠膜明串珠菌肠膜亚种、乳酸片球菌、戊糖片球菌、凝结魏茨曼氏菌、小牛动物球菌、木糖葡萄球菌、肉葡萄球菌、马克斯克鲁维酵母应符合国家卫健委（2022 年 第 4 号）的规定。

3.1.3 食品加工用酵母应符合 GB 31639 的规定。

3.1.4 食用葡萄糖应符合 GB/T 20880 和 GB 15203 的规定。

3.1.5 乳糖应符合 GB 25595 的规定。

3.1.6 白砂糖应符合 GB/T 317 和 GB 13104 的规定。

3.1.7 牛骨蛋白胨、大豆蛋白胨、鱼蛋白胨应符合附录 A 的规定。

3.1.8 酵母浸粉应符合附录 B 的规定。

3.1.9 酵母浸膏应符合附录 C 的规定。

3.1.10 牛肉浸粉应符合附录 D 的规定。

3.1.11 吐温-80 应符合 GB 25554 的规定。

3.1.12 硫酸镁应符合 GB 29207 的规定。

3.1.13 乙酸钠应符合 GB 30603 的规定。

3.1.14 乳粉应符合 GB 19644 的规定。

3.1.15 乳清粉、乳清蛋白粉应符合 GB 11674 的规定。

3.1.16 胶原蛋白肽应符合 GB 31645 的规定。

3.1.17 水解胶原蛋白应符合 QB 2732 的规定。

3.1.18 速溶豆粉应符合 GB/T 18738 的规定。

3.1.19 大豆肽粉应符合 GB/T 22492 的规定。

3.1.20 海洋鱼低聚肽粉应符合 GB/T 22729 的规定。

- 3.1.21 红糖粉应符合 GB/T 35885 和 GB 13104 的规定。
- 3.1.22 黑糖粉应符合 QB/T 4567 和 GB 13104 的规定。
- 3.1.23 麦芽糊精应符合 GB/T 20882.6 和 GB 15203 的规定。
- 3.1.24 抗性糊精、小麦低聚肽粉应符合卫生部 2012 年第 16 号公告的规定。
- 3.1.25 玉米淀粉应符合 GB/T 8885 和 GB 31637 的规定。
- 3.1.26 马铃薯淀粉应符合 GB/T 8884 和 GB 31637 的规定。
- 3.1.27 木薯淀粉应符合 GB/T 29343 和 GB 31637 的规定。
- 3.1.28 菊粉应符合卫计委《关于批准菊粉、多聚果糖为新资源食品的公告》（2009 年第 5 号）的规定。
- 3.1.29 低聚果糖应符合 GB/T 23528 的规定。
- 3.1.30 低聚木糖、阿拉伯半乳聚糖、燕麦 β -葡聚糖应符合《关于批准番茄籽油等 9 种新食品原料的公告》（2014 年第 20 号）的规定。
- 3.1.31 低聚异麦芽糖应符合 GB/T 20881 的规定。
- 3.1.32 大豆低聚糖应符合 GB/T 22491 的规定。
- 3.1.33 水苏糖应符合 QB/T 4260 的规定。
- 3.1.34 裸藻、低聚甘露糖应符合卫计委《关于批准裸藻等 8 种新食品原料的公告》（2013 年第 10 号）的规定。
- 3.1.35 聚葡萄糖应符合 GB 25541 的规定。
- 3.1.36 可可粉应符合 GB 20706 的规定。
- 3.1.37 咖啡粉应符合 NY/T 289 的规定。
- 3.1.38 果蔬粉应符合 NY/T 1884 的规定。
- 3.1.39 塔格糖、奇亚籽、圆苞车前子壳应符合卫计委公告（2014 年第 10 号）的规定。
- 3.1.40 酵母 β -葡聚糖应符合卫生部公告（2010 年第 9 号）和 QB/T 4572 的规定。
- 3.1.41 植物甾醇、DHA 藻油应符合卫生部公告（2010 年第 3 号）的规定。
- 3.1.42 玉米低聚肽粉、磷脂酰丝氨酸应符合卫生部公告 2010 年第 15 号的规定。
- 3.1.43 雨生红球藻应符合卫生部《关于批准雨生红球藻等新资源食品的公告》（卫生部第 17 号公告）的规定。
- 3.1.44 鱼油及提取物应符合卫生部《关于批准茶叶籽油等 7 种物品为新资源食品的公告》（2009 年第 18 号）的规定。
- 3.1.45 L-阿拉伯糖应符合卫生部《关于批准嗜酸乳杆菌等 7 种新资源食品的公告》（卫生部公告 2008 年第 12 号）的规定。
- 3.1.46 壳寡糖应符合卫计委《关于批准壳寡糖等 6 种新食品原料的公告》（2014 年第 6 号）的规定。
- 3.1.47 异麦芽酮糖醇应符合 QB/T 4486 的规定。

- 3.1.48雪莲培养物应符合卫生部《关于批准金花茶、显脉旋覆花(小黑药)等5种物品为新资源食品的公告》(2010年第9号)的规定。
- 3.1.49白芸豆提取物、桑叶提取物、针叶樱桃果粉应符合GB/T 29602的规定。
- 3.1.50海藻糖应符合GB/T 23529的规定。
- 3.1.51植物甾醇酯应符合原卫生部公告(2010年第3号)的规定。
- 3.1.52甘油二酯油应符合原卫生部公告(2009年第18号)的规定。
- 3.1.53乳矿物盐应符合原卫生部公告(2009年第18号)的规定。
- 3.1.54花生四烯酸油脂应符合GB 26401的规定。
- 3.1.55中长链脂肪酸食用油应符合原卫生部公告(2012年第16号)的规定。
- 3.1.56蔗糖聚酯应符合原卫生部公告(2012年第19号)的规定。
- 3.1.57茶树花应符合原卫计委公告(2013年第1号)的规定。
- 3.1.58磷虾油应符合原卫计委关于公告(2013年第16号)的规定。
- 3.1.59蛹虫草应符合原卫计委公告(2014年第10号)的规定。
- 3.1.60桃胶应符合卫健委2023年第8号公告的规定。
- 3.1.61酵母蛋白应符合卫健委2023年第10号公告的规定。
- 3.1.62杜仲籽油应符合原卫生部公告(2009年第12号)的规定。
- 3.1.63茶叶籽油应符合GB/T 35026和GB 2716的规定。
- 3.1.64棉籽低聚糖应符合原卫生部公告(2010年第3号)的规定。
- 3.1.65表没食子儿茶素没食子酸酯应符合原卫生部公告(2010年第17号)的规定。
- 3.1.66酵母抽提物应符合GB/T 23530的规定。
- 3.1.67食用盐应符合GB 2721的规定。
- 3.1.68果胶应符合GB 25533的规定。
- 3.1.69魔芋粉应符合NY/T 494的规定。
- 3.1.70瓜尔胶应符合GB 28403的规定。
- 3.1.71羟丙基二淀粉磷酸酯钠应符合GB 29936的规定。
- 3.1.72食品用香精应符合GB 30616的规定。
- 3.1.73羧甲基纤维素钠应符合GB 1886.232的规定。
- 3.1.74黄原胶应符合GB 1886.41的规定。
- 3.1.75木糖醇应符合GB 1886.234的规定。
- 3.1.76赤藓糖醇应符合GB 26404的规定。
- 3.1.77罗汉果甜苷应符合GB 1886.77的规定。
- 3.1.78柠檬酸应符合GB 1886.235的规定。
- 3.1.79L-苹果酸应符合GB 1886.40的规定。

- 3.1.80钝顶螺旋藻和玫瑰茄应符合卫生部 2004 年第 17 号公告的规定。
- 3.1.81人参（人工种植 5 年及 5 年以下）应符合原卫生部公告（2012 年第 17 号）的规定。
- 3.1.82人参提取物、罗汉果提取物、葛根提取物、马铃薯提取物应符合 GB/T 29602 的规定。

3.2 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求	检验方法
色 泽	具有产品应有的色泽	取适量样品置于洁净、干燥的烧杯中，在自然光条件下用肉眼观察其色泽、性状、杂质，嗅其气味，然后用温开水漱口，品尝其滋味
性 状	粉末或颗粒，无结块	
气味、滋味	具有产品应有的气、滋味，无异味	
杂 质	无肉眼可见外来杂质	

3.3 理化指标

理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标	检验方法
水分, g/100g	≤ 7.0	GB 5009.3
*铅（以 Pb 计），mg/kg	≤ 0.8	GB 5009.12
总砷（以 As 计），mg/kg	≤ 1.5	GB 5009.11
展青霉素 ^a ，μg/kg	≤ 20	GB 5009.185
产酸活力, h或ΔpH	符合标签声称	QB/T 4575
发酵酸度（以乳酸计），%	符合标签声称	QB/T 4575
注：*指标严于食品安全国家标准GB 31639的规定； a 适用于添加苹果和山楂及其制品的产品。		

3.4 微生物限量

微生物限量应符合表 3 的规定。

表 3 微生物限量

项 目	采样方案 ^a 及限量				检验方法	
	n	c	m	M		
活菌总数 ^b , CFU/g	≥	10 ⁸			附录 E	
灭活菌数 ^d , CFU/g	≥	10 ⁸			附录 F	
菌落总数 ^d , CFU/g		5	2	10 ³	5×10 ⁴	GB 4789.2
大肠菌群, CFU/g		5	2	10	100	GB 4789.3 中的平板计数法

沙门氏菌，/25g	不得检出	GB 4789. 4
金黄色葡萄球菌 ^o ，/25g	不得检出	GB 4789. 10
单核细胞增生李斯特氏菌，/25g	不得检出	GB 4789. 30
a 样品的采集及处理按 GB 4789. 1 和 GB 4789. 25 执行； b 适用于活菌型产品； d 适用于灭菌型产品。 e 不适用于含葡萄球菌产品。		

3.5 净含量及允许短缺量

应符合 JJF 1070 的规定。

3.6 生产加工过程的卫生要求

应符合 GB 14881 和 GB 31612 的规定。

3.7 其它要求

食品添加剂的使用应符合 GB 2760 的规定，真菌毒素限量应符合 GB 2761 的规定，污染物限量应符合 GB 2762 的规定，农药残留限量应符合 GB 2763 的规定，新食品原料的使用应符合国家相关公告的规定。

3 检验

出厂检验项目包括：感官要求、水分、活菌总数（适用于活菌型产品）、菌落总数（适用于灭菌型产品）、灭活菌数（适用于灭菌型产品）、大肠菌群、净含量及允许短缺量的检验。型式检验按国家相关规定执行。

附录 A

牛骨蛋白胨、大豆蛋白胨、鱼蛋白胨质量要求

1 原料来源

本规定适用于以新鲜牛骨头为原料，采用生物酶解和后期过滤，浓缩，喷雾干燥制成的牛骨蛋白胨或以大豆为原料，经粉碎、酶解、分离提取、干燥等工序制成的粉状蛋白胨或以鱼骨或鱼粉为原料，通过酶解，过滤，浓缩，干燥等工序制成的鱼蛋白胨。

2 指标要求

指标要求应符合表 A.1 的规定。

表 A.1 指标要求

项目		牛骨蛋白胨	大豆蛋白胨	鱼蛋白胨	检验方法
感官要求	色泽	微黄色至棕色粉末	乳白色至浅黄色粉末	浅黄色至棕黄色粉末	取适量样品置于干燥洁净的透明玻璃皿中，在自然光线下用肉眼观察其色泽和组织形态、杂质、并嗅其气味，温开水漱口后，品尝其滋味。
	滋气味	具有产品应有气味	具有产品应有气味	具有产品应有气味	
	组织形态	粉状	粉状	粉状	
	杂质	无肉眼可见外来杂质	无肉眼可见外来杂质	无肉眼可见外来杂质	
理化指标	总氮, %	≥ 14.5	8.0	14.5	GB 5009.5 或 GB/T 23530
	氨基酸态氮(以干基计), %	≥ 1.5	2.0	3.0	GB 5009.235 或 GB/T 23530
	pH	5.0-7.0	5.0-7.0	5.0-7.0	GB 5009.237
	灰分, %	≤ 6.0	15.0	10.0	GB 5009.4
	水分, %	≤ 6.0	7.0	5.0	GB 5009.3
	总砷(以 As 计), mg/kg	≤ 0.5	—	0.5	GB 5009.11
	镉(以 Cd 计), mg/kg	≤ 0.1	—	0.1	GB 5009.15
	铅(以 Pb 计), mg/kg	≤ 0.5	0.5	0.5	GB 5009.12
铬(以 Cr 计), mg/kg	≤ 1.0	—	1.0	GB 5009.123	
微生物指标	菌落总数, CFU/g	≤ 10000	50000	10000	GB 4789.2
	大肠菌群, MPN/g	≤ 0.3	0.3	0.3	GB 4789.3 中的 MPN 计数法
	霉菌和酵母菌, CFU/g	≤ 20	20	20	GB 4789.15
	沙门氏菌, /25g	n=5, c=0, m=0	不得检出	n=5, c=0, m=0	GB 4789.4
	金黄色葡萄球菌, CFU/g	n=5, c=1, m=100, M=1000	不得检出	n=5, c=1, m=100, M=1000	GB 4789.10 第二法

附录 B

酵母浸粉质量要求

1 原料来源

本规定适用于以高蛋白质含量的食用酵母为原料，采用现代生物工程技术精制而成的酵母浸粉。

2 指标要求

指标要求应符合表 B.1 的规定。

表 B.1 指标要求

项目		指标	检验方法
感官要求	色泽	黄色至淡黄色	取适量样品置于干燥洁净的透明玻璃皿中，在自然光线下用肉眼观察其色泽和组织形态、杂质、并嗅其气味，温开水漱口后，品尝其滋味。
	滋气味	具有酵母浸粉应有的气、滋味，无腐败异臭	
	组织形态	粉状	
	杂质	无肉眼可见外来杂质	
理化指标	总氮, %	≥ 9.0	GB 5009.5 或 GB/T 23530
	氨基酸态氮(以干基计), %	≥ 3.0	GB 5009.235 或 GB/T 23530
	pH	5.3-7.2	GB 5009.237
	灰分, %	≤ 15.0	GB 5009.4
	水分, %	≤ 6.0	GB 5009.3
	总砷(以 As 计), mg/kg	≤ 0.5	GB 5009.11
	铅(以 Pb 计), mg/kg	≤ 1.0	GB 5009.12
微生物指标	菌落总数, CFU/g	≤ 50000	GB 4789.2
	大肠菌群, MPN/g	≤ 0.3	GB 4789.3 中的 MPN 计数法
	霉菌和酵母菌, CFU/g	≤ 20	GB 4789.15
	沙门氏菌, /25g	不得检出	GB 4789.4
	金黄色葡萄球菌, /25g	不得检出	GB 4789.10

附录 C

酵母浸膏质量要求

1 原料来源

本规定适用于以纯化培养的高品质酵母为原料，采用生物定向降解、高速离心分离、高效低温浓缩等生物技术制备得到的酵母浸膏。

2 指标要求

指标要求应符合表 C.1 的规定。

表 C.1 指标要求

项目		指标	检验方法
感官要求	色泽	浅棕色	取适量样品置于干燥洁净的透明玻璃皿中，在自然光线下用肉眼观察其色泽和组织形态、杂质、并嗅其气味，温开水漱口后，品尝其滋味
	滋气味	具有酵母浸膏应有的气、滋味	
	组织形态	膏状	
	杂质	无肉眼可见外来杂质	
理化指标	总氮, % \geq	9.0	GB 5009.5 或 GB/T 23530
	氨基酸态氮(以干基计), % \geq	3.0	GB 5009.235 或 GB/T 23530
	pH	4.0-7.5	GB 5009.237
	灰分, % \leq	15.0	GB 5009.4
	水分, % \leq	35.0	GB 5009.3
	谷氨酸, % \leq	12.0	GB/T 23530
	总砷(以 As 计), mg/kg \leq	0.5	GB 5009.11
	铅(以 Pb 计), mg/kg \leq	1	GB 5009.12
微生物指标	菌落总数, CFU/g \leq	20000	GB 4789.2
	大肠菌群, MPN/g \leq	0.3	GB 4789.3 中的 MPN 计数法
	沙门氏菌, /25g	不得检出	GB 4789.4
	金黄色葡萄球菌, /25g	不得检出	GB 4789.10

附录 D

牛肉浸粉质量要求

1 原料来源

本规定适用于以新鲜的牛肉为原料，经热处理、过滤、水解、浓缩、干燥等工序制备得到的牛肉浸粉。

2 指标要求

指标要求应符合表 D.1 的规定

表 D.1 指标要求

项目		指标	检验方法
感官要求	色泽	乳白色或浅黄色	取适量样品置于干燥洁净的透明玻璃皿中，在自然光线下用肉眼观察其色泽和组织形态、杂质、并嗅其气味，温开水漱口后，品尝其滋味。
	滋气味	具有牛肉浸粉应有气、滋味， 无异味	
	组织形态	粉状	
	杂质	无肉眼可见外来杂质	
理化指标	总氮, %	≥ 14.5	GB 5009.5 或 GB/T 23530
	氨基酸态氮(以干基计), %	≥ 2.0	GB 5009.235 或 GB/T 23530
	pH	5.0-6.0	GB 5009.237
	灰分, %	≤ 5.0	GB 5009.4
	水分, %	≤ 5.0	GB 5009.3
	总砷(以 As 计), mg/kg	≤ 0.5	GB 5009.11
	镉(以 Cd 计), mg/kg	≤ 0.1	GB 5009.15
	铅(以 Pb 计), mg/kg	≤ 0.5	GB 5009.12
铬(以 Cr 计), mg/kg	≤ 1.0	GB 5009.123	
微生物指标	菌落总数, CFU/g	≤ 15000	GB 4789.2
	大肠菌群, MPN/g	≤ 0.9	GB 4789.3 中的 MPN 计数法
	霉菌和酵母菌, CFU/g	不得检出	GB 4789.15
	沙门氏菌, /25g	n=5, c=0, m=0	GB 4789.4
	金黄色葡萄球菌, CFU/g	n=5, c=1, m=100, M=1000	GB 4789.10 第二法

附录 E

活菌总数检验方法

样品中含有的种属类别	检验方法 ^a
乳杆菌属和（或）双歧杆菌属和（或）嗜热链球菌等 ^b	按照GB 4789.35或GB 4789.34或QB/T 4575附录B进行检验，结果即为活菌总数
以上种属及凝结魏茨曼氏菌、酵母的组合复配	按照上述方法和QB/T 5949、GB 4789.15分别进行测定，再加和即为活菌总数
<p>^aQB/T 4575附录B中方法仅适用于含单一菌属（种）的活菌总数检验；利用QB/T 4575附录B中方法对样品进行活菌总数检验，检验报告应明确所用方法。</p> <p>^b还包括乳酪杆菌属、粘液乳杆菌属、乳植杆菌属、联合乳杆菌属和广布乳杆菌属。</p>	

附录 F

T/CBFLA 95901-2023

附录 A
(资料性)
菌体数检测方法

A.1 流式细胞仪计数

A.1.1 目的

通过流式细胞仪对后生元进行死菌体数统计。

A.1.2 材料及设备

荧光染料：PI (Propidium Iodide, 碘化丙啶)、EB、7-AAD、SYTOX、Annexin V; 1 mg/mL (溶于DMSO中), SYTO9; 5 mmol (溶于DMSO中) PBS (pH7.2)

A.1.3 实验方案

A.1.3.1 取1 mL 后生元悬液于灭菌后的2 mL EP管, 4000g, 5 min 离心, 离心后的沉淀重悬于生理盐水中 (pH7.2)。

A.1.3.2 将复溶后样品 10 倍递增系列稀释到菌悬液浓度为 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL 待用。

A.1.3.3 各取稀释后的液体 980 μ L, 分别加入两个 2 mL 离心管中, 记为:

——阴性对照 (-); 只加入菌悬液;

——SYTO9/PI 双染: 分别加入 10 μ L 0.1 mmol/L 的 SYTO9, 10 μ L 0.2 mmol/L 的 PI, 振荡 30 s, 室温暗置孵育 15 min。

A.1.3.4 取上述双染样品 200 μ L, 加入菌体绝对计数微球 (Flow-Count Fluorospheres, beckman), 充分振荡混匀, 上机检测。

A.1.3.5 计算公式: 总菌数 = (SYTO9 染色菌性和 PI 染色阳性菌的个数/绝对计数微球数) \times 绝对计数微球数浓度 \times 稀释倍数。

A.2 显微镜计数

A.2.1 目的

利用细菌计数板对样品中死菌体数进行计数。

A.2.2 材料和设备

相差显微镜、细菌计数板、天平、丝口瓶、移液器或微量取样器、生理盐水。

A.2.3 试验方案

A.2.3.1 细菌计数板的基本构造

细菌计数板计数区的刻度有两种: 一种是计数区分成16个大方格 (大方格用三线隔开), 而每个大方格又分成25个小方格; 另一种是一个计数区分成25个大方格 (大方格之间用双线分开), 而每个大方格又分成16个小方格, 两种构造, 计数区都由400个小方格组成, 计数区边长为1 mm, 则计数区的面积为1 mm², 每个小方格的面积为1/400 mm²。盖上盖玻片后, 计数区的高度为0.1 mm, 所以每个计数区

T/CBFIA 09001—2023

的体积为 0.1 mm^3 ，每个小方格的体积为 $1/4\ 000\text{ mm}^3$ 。使用细胞计数板计数时，先要测出每个小方格中微生物的数量，再换算成每毫升菌液（或每克样品）中微生物细胞的数量。

A.2.3.2 检测

A.2.3.2.1 样品处理

A.2.3.2.1.1 准确称取样品 25.0 g （ 25.0 mL ）溶于 225 mL 无菌生理盐水中，振荡混合均匀。

A.2.3.2.1.2 取出上述 1 mL 稀释菌液加入 9 mL 生理盐水，以此方式加倍连续系列稀释至适宜梯度，备用。

A.2.3.3 计数

A.2.3.3.1 在加样前，先对计数板的计数室进行镜检，若有污物，则需清洗、吹干后进行计数。

A.2.3.3.2 加菌悬液样品：将菌悬液吸出少许，从计数板边缘的沟槽内沿盖玻片的下边缘滴入一小滴（不宜过多），让菌悬液利用液体的表面张力充满计数区，防止气泡产生，并用吸水纸吸去沟槽中流出的多余菌悬液，也可以将菌悬液直接滴加在计数区上。

A.2.3.3.3 显微镜计数：先在低倍镜下找到计数区后，再转换高倍镜观察并计数（低倍镜观察时光线尽量调暗，转换高倍镜后先微调光线）。

A.2.3.3.4 计数时若计数区是由 16 个大方格组成，按对角线方位，数左上、左下、右上、右下的 4 个大方格（即 100 小格）的菌数，如果是 25 个大方格组成的计数区，除数上述 4 个大方格外，还需数中央 1 个大方格的菌数（即 80 个小格）。如菌体位于大方格的双线上，计数时则数上线不数下线，数左线不数右线，以减少误差，即位于本角上线和左线上的细胞计入本格，本格的下线和右线上的细胞按规定计入相应的格中。如镜下偶见有两个以上细胞组成的细胞团，应按单个细胞计算，若细胞团 10% 以上，说明分散不好，需重新制备菌悬液。

A.2.3.4 计算结果

1) 16 格 $\times 25$ 格菌体数按公式(A.1)计算：

$$Y_1 = \frac{Y_1}{100} \times 400 \times b \times 10^4 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

- Y_1 ——细胞数，单位为个每毫升（个/mL）；
 y_1 —— 100 小格内细菌个数，单位为个；
 b ——稀释倍数。

2) 25 格 $\times 16$ 格菌体数按公式(A.2)计算：

$$Y_2 = \frac{Y_2}{80} \times 400 \times b \times 10^4 \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

- Y_2 ——细胞数，单位为个每毫升（个/mL）；

T/CBFLA 09004-2023

y_2 ——80小格内细胞个数，单位为个；
 b ——稀释倍数。

A.2.4 结果与报告

根据菌落计数结果出具报告，报告单位以个/g (mL) 表示。

中国生物发酵产业协会团体标准

编制说明

本标准适用于以青春双歧杆菌、动物双歧杆菌动物亚种、动物双歧杆菌乳亚种、两歧双歧杆菌、短双歧杆菌、长双歧杆菌长亚种、长双歧杆菌婴儿亚种、嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种、德氏乳杆菌乳亚种、格氏乳杆菌、瑞士乳杆菌、约氏乳杆菌、马乳酒样乳杆菌马乳酒样亚种、干酪乳酪杆菌、副干酪乳酪杆菌、鼠李糖乳酪杆菌、发酵粘液乳杆菌、罗伊氏粘液乳杆菌、植物乳植杆菌、唾液联合乳杆菌、弯曲广布乳杆菌、清酒广布乳杆菌、唾液链球菌嗜热亚种、乳酸乳球菌乳亚种、乳酸乳球菌乳亚种（双乙酰型）、乳脂乳球菌、费氏丙酸杆菌谢氏亚种、产丙酸丙酸菌、肠膜明串珠菌肠膜亚种、乳酸片球菌、戊糖片球菌、凝结魏茨曼氏菌、小牛动物球菌、木糖葡萄球菌、肉葡萄球菌、马克斯克鲁维酵母中的一种或多种为菌种，选取水、食用葡萄糖、乳糖、白砂糖、牛骨蛋白胨、酵母浸膏、酵母浸粉、牛肉浸粉、大豆蛋白胨、鱼蛋白胨中的多种原料配制发酵培养基，经接种、发酵[食品加工助剂（吐温 80、乙酸钠、硫酸镁）]、浓缩（或不浓缩）、离心（或不离心）、乳化（或不乳化）、冻干、粉碎制成益生菌粉，再添加乳粉、乳清粉、乳清蛋白粉、胶原蛋白肽、水解胶原蛋白、速溶豆粉、大豆肽粉、海洋鱼低聚肽粉、红糖粉、黑糖粉、麦芽糊精、抗性糊精、小麦低聚肽粉、玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉、菊粉、低聚果糖、低聚木糖、低聚异麦芽糖、大豆低聚糖、水苏糖、低聚甘露糖、聚葡萄糖、可可粉、咖啡粉、果蔬粉（山药、胡萝卜、南瓜、黄瓜、黄秋葵、苦瓜、木瓜、红枣、苹果、山楂、草莓、芒果、蓝莓、西柚、百香果、橙子、沙棘、香蕉、水蜜桃、荔枝、蔓越莓、桑葚、猕猴桃、圣女果、樱桃、西瓜、哈密瓜、火龙果、石榴、梨、青梅、柠檬、金桔、桂圆、牛油果、葡萄、菠萝、枸杞、枇杷、黑果枸杞、菊芋中的一种或几种）、钝顶螺旋藻、玫瑰茄、人参（人工种植 5 年及 5 年以下）或提取物、葛根提取物、罗汉果提取物、塔格糖、奇亚籽、酵母 β -葡聚糖、雪莲培养物、磷脂酰丝氨酸、植物甾醇、雨生红球藻、DHA 藻油、鱼油及提取物、圆苞车前子壳、异麦芽酮糖醇、L-阿拉伯糖、玉米低聚肽粉、裸藻、壳寡糖、阿拉伯半乳聚糖、马铃薯提取物、燕麦 β -葡聚糖、白芸豆提取物、海藻糖、针叶樱桃果粉、植物甾醇酯、甘油二酯油、乳矿物盐、花生四烯酸油脂、中长链脂肪酸食用油、蔗糖聚酯、茶树花、磷虾油、蛹虫草、桃胶、酵母蛋白、杜仲籽油、茶叶籽油、棉籽低聚糖、表没食子儿茶素没食子酸酯、桑叶提取物、酵母抽提物、食用盐、魔芋粉中的一种或几种，加入或不加入果胶、瓜尔胶、羟丙基二淀粉磷酸酯、黄原胶、羧甲基纤维素钠、食品用香精、食品加工用酵母、木糖醇、赤藓糖醇、罗汉果甜苷、柠檬酸、L-苹果酸中的一种或几种，经混合、制粒或不制粒、灭菌或不灭菌、包装制成的益生菌复合粉。

根据《中华人民共和国食品安全法》和《中华人民共和国标准化法》的有关规定，参照相关标准制订本企业标准，作为组织生产、质量控制和监督检查提供依据。

本标准中铅指标严于食品安全国家标准GB 31639的规定。

郑州和合生物工程技术有限公司