

专家述评

食品用菌种安全性评价的新技术、新方法和新理念以及对监管的启发

白莉¹, 韩小敏¹, 李孟寒¹, 丁郁², 陈潇¹, 宋雁¹, 董银苹¹, 田静¹, 罗雪云¹, 李宁¹, 刘兆平¹(1. 国家食品安全风险评估中心 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 中国医学科学院
创新单元(2019RU014), 北京 100021; 2. 暨南大学, 广东 广州 510610)

摘要:对食品用菌种的法规监管全球尚未形成统一的标准,以致病性、产毒特征和耐药性等为基础的菌种安全性评价和对消费者使用的安全性评价仍是各国监管的重点。目前各国对食品用菌种的潜在和新发风险的安全性评价技术、方法和理念也在不断发展和完善。随着技术、方法和理念的革新,运用下一代风险评估技术,结合临床(前)研究新方法和分级分类管理新理念,成为开展食品用菌种包括遗传修饰微生物安全性评价的重要手段。这些措施提高了食品用菌种安全性评价的科学性和准确性,也成为全面落实“大食物观”的重要内容。本文系统梳理全球食品用菌种安全性评价的新技术、新方法和新理念及其应用现状,为我国食品用菌种的监督管理提供参考和借鉴。

关键词:食品用菌种; 安全性评价; 新技术、新方法和新理念; 监督管理

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2025)01-0001-09

DOI: 10.13590/j.cjfh.2025.01.001

New technologies, methods and concepts, and inspiration for supervision for the safety evaluation of food cultures

BAI Li¹, HAN Xiaomin¹, LI Menghan¹, DING Yu², CHEN Xiao¹, SONG Yan¹, DONG Yinping¹,
TIAN Jing¹, LUO Xueyun¹, LI Ning¹, LIU Zhaoping¹(1. NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk
Assessment, Chinese Academy of Medical Science Research Unit (2019RU014), Beijing 100021, China;
2. Ji'nan University, Guangdong Guangzhou 510610, China)

Abstract: There is no unified global standard for regulations and supervisions of food cultures and the safety evaluation of strains based on the pathogenicity, toxin-producing characteristics and drug resistance, as well as their safe use among consumers are still the focus of regulations in various countries. The safety evaluation techniques and strategies for the potential and emerging risks of food cultures are still in a state of ongoing refinement. With the innovation of technologies, methods and concepts, the application of next-generation risk assessment technology, combined with new clinical (pre-) research methods and new concepts of hierarchical and classification management, have become important means to carry out safety evaluation of food cultures, including genetically modified microorganisms. These advancements have enhanced the scientificity and accuracy of safety evaluation for food cultures, contributing as a significant part of the comprehensive implementation of all-encompassing approach to food concept. This paper systematically reviews new technologies, methods and concepts from a global perspective and their application status of the safety evaluation of food cultures, which provides reference for the supervision of food cultures used in China.

Key words: Food cultures; safety evaluation; new technologies, methods and concepts; supervision and management

收稿日期: 2024-09-26

基金项目: 国家食品安全风险评估中心高层次人才队伍建设项目(2024高层次人才2.8); 科技部重点研发计划(2023YFF1104100)

作者简介: 白莉 女 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: baili@cfsa.net.cn

韩小敏 女 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: hanxiaomin@cfsa.net.cn

白莉和韩小敏为并列第一作者

通信作者: 刘兆平 男 研究员 研究方向为食品安全 E-mail: liuzhaoping@cfsa.net.cn

习近平总书记强调“树立大农业观、大食物观,向耕地草原森林海洋、向植物动物微生物要热量、要蛋白,全方位多途径开发食物资源”^[1]。2024年9月,国务院办公厅印发的《关于践行大食物观构建多元化食物供给体系的意见》中进一步强调了“大食物观”的重要来源即“向植物动物微生物要热量、要蛋白,拓展食物直接和间接来源”^[2]。微生物以其生长快速、营养需求简单、目标物质产量高等优势,被认为是践行“大食物观”的重要载体^[3]。食品用菌种及制剂是食品微生物的重要组成,在食品生产和加工过程中扮演着重要角色,它们不仅能够增强食品的风味、颜色和质地,还能提升食品的健康和营养价值^[4]。

全球多个国家和国际组织均认为致病性、产毒特征和耐药性等是目前食品用菌种安全性评价的重点,但尚未形成统一的管理规定^[5-8]。此外,研究发现一些具有传统使用历史并列入食品用菌种名单的菌种,以及部分新开发的菌种,在运用新技术新方法开展安全性评价时,可识别出潜在安全风险^[9-11]。因此,为更好地落实“大食物观”,保障食品用菌种的使用安全、助力健康中国建设,本文就目前全球食品用菌种安全性评价面临潜在风险的应对策略,特别是新技术、新方法和新理念的应用情况进行归纳和总结。

1 安全性评价的新技术、新方法和新理念

形态学鉴定、生理生化测定和动物实验等是食品用菌种安全性评价的经典方法。近年来随着新菌种的不断发现和新技术、新方法的飞速发展,部分不具有传统使用历史的菌种和遗传修饰微生物不断被挖掘和应用,新发风险和非预期效应也伴随出现,并日益受到关注^[5-11]。因此,有必要引入新技术、新方法和新理念用于食品用菌种的安全性评价。

1.1 新技术

1.1.1 组学

全球多个国际组织自2018年起提出了利用组学技术开展下一代风险评估的科学建议^[12-14]。目前,组学技术已成为研究食品用菌种的重要手段。它为食品用菌种风险因子的挖掘提供了简单、快速、有效的方法,可用于微生物的精准表征,初步预测与安全性相关的基因、蛋白质和代谢产物等^[5-8,12-14]。常用的组学技术包括基因组学、宏基因组学、转录组学、蛋白组学和代谢组学等^[5-8,12-14]。

1.1.1.1 基因组学

基因组学是研究生物体的基因组结构、功能、演化、组装、编辑等方面的交叉学科^[12]。全基因组

测序(Whole genome sequencing, WGS)技术是目前基因组学研究中最常用的技术,也是目前食品用菌种分类鉴定的金标准^[15]。欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)在2024年也更新了食品用菌种开展WGS测序的要求^[15]。该文件明确指出对于某些受监管的菌种及相关产品来说,必须进行菌种的WGS分析并将其作为安全性评价的重要组成部分;WGS技术不仅能提供菌种鉴定的准确信息,还能提供菌种是否携带相关基因的信息,如毒力基因、抗生素抗性基因(Antimicrobial resistance genes, ARGs)和不良代谢产物基因等^[15]。以ARGs筛查为例,WGS技术结合耐药表型分析能够实现对抗生素固有耐药和获得性耐药的精准鉴定^[16]。其次,WGS技术还可解码与食品用菌种的代谢和基因组稳定性等相关的基因,如质粒、插入序列和原噬菌体等可移动遗传元件^[17]。此外,应用该技术还发现已作为有益微生物或食品工业用的部分菌株可能携带毒力或产毒基因,如部分丁酸梭菌菌株可携带E型肉毒毒素基因,并引起新生儿坏死性小肠结肠炎和肉毒中毒^[11];部分黑曲霉菌株可携带伏马菌素合成基因簇,在适宜条件下产生高水平伏马菌素^[18];部分红曲霉菌株可携带桔青霉素合成基因簇^[19]。上述研究表明WGS技术已成功用于致病基因、耐药机制和毒素合成基因等风险因素的挖掘与分析。

1.1.1.2 宏基因组学

宏基因组学是一种以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象,以功能基因筛选和测序分析为研究手段,以微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系为研究目的的新型微生物研究方法^[20]。该技术可用于食品中微生物群落的遗传特征分析,揭示食品中微生物群落构成,为检测是否存在有害微生物并评估其相对丰度提供了有效手段^[20]。该技术还被用于预测微生物群落中的有益或有害代谢途径的挖掘,如基于该技术发现不同质量等级中温大曲微生物组的异质性,阐明了不同质量等级大曲的酶活性和酸度差异的微生物学基础^[21-22]。在评估对人类健康影响方面,该技术可用于分析消费者肠道菌群的构成,挖掘其潜在的有益或有害微生物^[23]。此外,宏基因组学与宏转录组学的结合使用,可揭示微生物的体内表达模式,助力有益生作用的微生物与宿主肠道微生物间的动态互作机制分析^[24]。CARLINO等^[25]对来自2500个食品的宏基因组数据进行分析,构建了可获取的食品宏基因组数据库、基于种水平的基因组箱(Species-level genome bins, SGB),发现了320个之前未有描述记录的分类群、食品微

生物多样性,还发现食品微生物的种群平均占人类肠道微生物种群的 3%,以及微生物从食品到肠道传播和定植的潜在实例。上述研究表明宏基因组学将有助于提升人们对食品微生物组 and 食品微生物组在塑造人类微生物组中作用的认识,也将在食品用菌种的安全性评价方面发挥重要的作用。

1.1.1.3 转录组学

转录组学是揭示能够修饰基因表达谱不同影响因素的组学,可以帮助解析基因表达模式和基因组动态。基因表达微阵列技术和 RNA 测序技术是目前转录组学研究中最常用的技术^[26-30],可协助确定与毒力、ARGs 和有害代谢物产生等相关基因的表达和调节情况。研究发现,有益生作用的菌株在生物体内遭受酸、胆汁、蛋白酶等各种压力时,菌株的毒力或耐药基因的 mRNA 表达谱会发生变化,如长双歧杆菌 BBMN68 和嗜酸乳杆菌 NCFM 在胆汁应激诱导下,可引起前者溶血素样蛋白的基因表达量上升并影响其在结肠中的存活能力,还可引起后者编码 ABC 型多药/抗生素转运系统基因的 mRNA 表达量上升并导致耐药性的改变^[27-29]。对食品工业用黑曲霉伏马菌素合成关键基因的分析发现,*fum6*、*fum14* 和 *fum19* 的 mRNA 表达量与毒素产量密切相关^[30]。上述研究表明转录组学技术可用于追踪分析食品用菌种在不同状态下安全性相关基因的 mRNA 表达情况。

1.1.1.4 蛋白组学

蛋白组学是研究细胞、组织或生物体中的蛋白组成及其变化规律的组学,可提供食品用菌种在不同生长阶段的蛋白组信息,有助于揭示转录组和功能活性蛋白组间的联系^[31-33]。基于凝胶的蛋白组学和质谱联用技术是目前蛋白组学研究最常用的技术,也是与毒力或致病等相关的蛋白常用鉴定方法。如利用该技术鉴定了戊糖乳杆菌 MP10 与抗生素耐药和消毒剂耐受相关的关键蛋白,在亚致死浓度的抗生素(阿莫西林、氯霉素和四环素)和消毒剂(苯扎氯铵和三氯生)作用下,可引起戊糖乳杆菌 MP10 的 NADH 过氧化物酶、小热休克蛋白、核糖体蛋白和谷氨酰-tRNA 合成酶等蛋白的表达量上升,碳水化合物和能量产生相关蛋白的表达量下降,最终使得该菌可应对多种环境条件的改变^[31]。此外,蛋白组学技术还可用于功能蛋白组的分析,研究发现食品工业用黑曲霉和里氏木霉等可产生一系列具有催化活性的新颖蛋白复合体^[32]。近年来,该技术还被用于分析菌株表面暴露的复杂蛋白网络,如菌株的蛋白网络是菌株与胃肠道环境适应相互作用的分子基础^[33]。上述研究表明蛋白组学技术可

作为一种解析蛋白功能的有效技术用于食品用菌种的安全性评价。

1.1.1.5 代谢组学

代谢组学主要是研究生命个体对外源性的刺激、环境变化或遗传修饰作出的所有代谢应答,可绘制出整体的代谢动态变化谱图。因此,该技术可直接用于整个生长周期中代谢产物的定性和定量检测,并识别出具有生物学意义的生物标志物^[34-37]。代谢组学分为靶向代谢组学和非靶向代谢组学,常用的技术包括气相色谱串联质谱、液相色谱串联质谱和核磁共振等。该技术已被应用于微生物代谢途径的挖掘和次级代谢产物的分析,如微生物培养物中 D-乳酸或生物胺等有害代谢物的定量分析和不同工业地点来源的微生物代谢多样性分析^[34-35]。该技术还用于阐明微生物与宿主间的互作机制,如研究发现宿主肠道微生物群的特征与宿主本身的健康状况相关,即肠道微生物分泌的多巴胺代谢物 3,4-二羟基苯乙酸的含量与宿主的心理健康呈正相关^[36]。该技术还可与同位素示踪技术结合,用于改进或揭示发酵过程中微生物的代谢状态,提高微生物的生产性能,如发现特定条件下酿酒酵母合成苹果酸的能力明显高于马克思克鲁维酵母^[37]。上述研究表明代谢组学技术已广泛用于食品用菌种风险因素的挖掘和代谢产物的分析。

1.1.2 毒理学替代测试法

毒理学替代测试法是下一代风险评估的重要发展方向,旨在通过运用体外细胞系、组织或器官模型或计算机模型预测技术,以及采用低等生物替代高等生物的策略,达到减少乃至替代传统的动物毒性实验的目标^[38]。目前毒理学替代测试法中的体外试验和非生物测试法等为食品用菌种的安全性评价提供了高效、快速和精准的方法,有助于进一步阐明引发毒性作用的靶器官以及引起致病性和致毒机制相关的信号通路。基于此,众多毒理学替代技术成为食品用菌种及相关产品安全性评价的关键方法。

1.1.2.1 体外实验替代整体动物试验

目前,体外实验主要是利用体外培养的动物源或人源化的细胞、组织和器官等模型开展研究,这些模型在细胞层面的应用较为普遍。EFSA 早在 2014 年就使用体外实验评估菌株的细胞毒性,如通过测定 ¹⁴-C 亮氨酸的摄入量、乳酸脱氢酶的释放量、碘化丙啶的摄入量等分析了芽孢杆菌的产毒能力及对 Vero 细胞的毒性效应^[39-40]。另有研究采用 HeLa、HT-29、Caco-2 等上皮细胞研究待测菌株对上皮细胞的黏附性和侵袭性^[41]。组织和器官水平的

研究,如类器官和虚拟组织模型,因能最大程度地模拟体内组织/器官的结构和功能并能长期稳定传代培养,被越来越多地用于微生物的毒力测试,如将小肠类器官模型应用于肠道上皮-病原菌间相互作用分析^[42]。美国食品药品监督管理局(U. S. Food and Drug Administration, FDA)也在努力开发和应用基于类器官芯片技术和三维细胞培养平台等替代毒理学新方法^[43]。同时,经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)也提出了一些替代方案,如利用3D技术重建的人类表皮模型为评估原发性皮肤刺激提供了有效替代方案^[44]。

1.1.2.2 低等动物和有限知觉的生物替代脊椎动物试验

果蝇、大蜡螟和斑马鱼等生物因其独特的生物学特性成为脊椎动物试验的替代方案。研究发现果蝇作为成熟的病原菌感染模型,已被应用于大规模遗传体系筛选并阐明了调控肠道免疫炎症平衡的新机制^[45]。大蜡螟幼虫作为传染病替代模型,被用于鼠李糖乳杆菌、丁酸梭菌、鼠伤寒沙门菌、李斯特菌属和分枝杆菌属的感染性分析^[46]。斑马鱼作为一种脊椎动物模型,被广泛用于微生物感染与免疫及自噬方面的研究,如将嗜酸乳杆菌 JCM1132 作为添加剂饲喂亲代斑马鱼,同时对其孵化的幼鱼用嗜水气单胞菌攻毒,研究嗜酸乳杆菌对斑马鱼子代幼鱼免疫功能的影响。结果发现,在攻毒后 5~8 d,嗜酸乳杆菌组的幼鱼死亡率显著高于对照组,在攻毒后 5、24 和 48 h,嗜酸乳杆菌组幼鱼的 *il1b* 和 *nfbiaa* 转录显著低于对照组。结果表明,嗜酸乳杆菌饲喂斑马鱼亲代后并不能提高子代斑马鱼的免疫功能^[47]。

1.1.2.3 非生物测试方法

非生物性测试方法是指基于计算机开发、可用于检测全身毒性的预测方法。该方法解决了因人体细胞和组织的伦理问题导致的可用性受限的难题,主要包括定量构效关系模型、基于生理学的动力学模型、基于虚拟细胞分析的模型、分组和交叉参照^[48-50]。该方法已被美国 FDA 和 EFSA 等成功用于药品和化妆品等的毒理学评价,相关计算工具如 Toxmatch 和 Toxtree,以及在线咨询数据库如 ChemAgora 和 CheLIST。由此可见,这些非生物性测试方法将在食品用菌种安全性评价中发挥重要作用^[48-50]。

1.1.3 机器学习技术

机器学习技术是指通过算法开发和统计学模型构建等,利用计算机系统在数据关联模式容缺的

情况下通过对示例数据进行推理训练,学习其规律及模式,并对新数据进行预测。该技术广泛用于生物医学与公共卫生等领域,揭示拥有大量数据积累但原理尚不清晰的数据间的关联^[51-54]。以抗生素耐药性(Antimicrobial resistance, AMR)的测定为例,机器学习方法使用基因组 k-mer 作为输入特征,实现了超过 95% 的预测准确性,还能够有效识别出新的 AMR 基因或突变位点,并在溯源识别中获得 85% 以上的准确率^[51]。此外,机器学习技术实现了有益生作用微生物的高效靶向筛选,准确度可达 97.77%^[53]。使用机器学习模型开发的生物信息学分析工具如 iProbiotics 和 metaProbiotics 等,能够基于宏基因组分箱数据和全基因组测序数据等组学数据对菌种进行精准、高效、系统化的表征,对于发掘新型食品用菌种和描述有益生作用的菌种对宿主健康的异质性作用具有广阔的应用前景^[53-54]。

1.2 临床前和临床研究新方法

除菌种的自身安全性,食品用菌种尤其是有益生作用菌种的安全性还涉及消费者直接使用风险等。爱尔兰食品安全局也于 2024 年 7 月 8 日发布了《食品补充剂中“益生菌”安全性评价报告》,旨在帮助企业在没有具体法规标准的情况下评价食品补充剂中使用的“益生菌”的安全性^[55]。该报告重点关注有生理风险人群的菌血症、败血症、心内膜炎等相关风险,并提出了科学建议^[55]。现有研究表明,大多数已发表的临床前和临床研究不仅存在数据不一致的现象,还存在未能充分评价其安全性的问题。因此,有必要借鉴临床前和临床研究的新方法以探讨其在实际使用场景下的安全性。

1.2.1 临床前研究

对于缺乏既往安全使用历史,且未被纳入欧盟安全资格认证(Qualified Presumption of Safety, QPS)和美国一般公认安全(Generally Recognized As Safe, GRAS)名单等官方正面清单的菌种,必须开展更为广泛且深入的临床前研究,包括但不限于动物研究。与化学物质的毒性测试不同,活性口服制剂的安全性评价需特别关注传统动物毒性数据与菌种安全性的相关性,并开展个案分析,同时甄选适宜的动物模型并谨慎考虑微生物引起的感染等潜在风险^[56-58]。如采用 Toll 样受体 7 依赖性小鼠模型(即狼疮易感小鼠模型)研究发现,饮食可影响小鼠的肠道微生物菌群和全身免疫反应,小鼠饲喂罗伊氏乳杆菌后肠道内乳杆菌的数量增加,加剧系统性红斑狼疮的发展,但通过摄入抗性淀粉则能有效抑制该现象,减轻病症^[9]。此外,被作为下一代有益生作用的菌种嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*)虽

可减缓肠道炎症,但在特定条件下,该菌可通过诱导自身免疫引起小鼠去糖基化抗原 IgA1 的识别并促进免疫性肾病的发生^[10]。因此,对于部分特殊人群如免疫缺陷患者、老年人和婴幼儿,建议采用模拟人类特定病理生理条件的动物模型,如心内膜炎模型、免疫缺陷模型和结肠炎模型等,进一步细化安全性评价的方案^[58-60]。

1.2.2 临床研究

目前,国际上对于经口摄入的活的微生物的临床试验已达成了如下共识。首先,如果该菌具有足够的安全使用历史,被充分鉴定,经 WGS 测定未发现致病基因或耐药基因,且预期用途被认为是安全的情况下,给予一般健康人群使用时可免于第 I 阶段的临床研究^[5-8]。另外,对于没有足够的安全使用历史,或有不良事件(Adverse events, AEs)报道的微生物,必须设计严谨的临床研究以验证其安全性^[5-8]。对于特定人群或疾病状态人群则需要更科学的长期安全性评价,如适用于早产儿的有益生作用的菌株,建议进行至少 2 年的随访研究,并重点关注代谢、过敏、免疫功能等关键指标^[5-8]。目前对特定人群的有益生作用的菌株安全性的科学认识尚不充分,还不能形成关于其长期安全性的共识,但有益生作用的菌株的长期安全性评价标准不应过度严苛,甚至超过现行的生物药品管理体系^[5-8,61-63]。

临床试验的设计与实施应严格规定剂量和持续时间,并建立严密的 AEs 监测机制,确保参与者的权利、安全和福祉得到最大程度的保障^[61-63]。建议引入临床研究方法如试验设计、实施和报告都应符合良好的临床实践、临床试验方案规范指南(Standard protocol items: recommendations for interventional trials, SPIRIT)和随机平行对照试验报告规范(Consolidated Standards of Reporting Trials, CONSORT)等,以确保设计、执行和报告的透明度与科学性。还需依据 SPIRIT 和 CONSORT 的要求全面报告其健康效应与潜在风险^[64-65]。

1.3 分级分类管理新理念

PARIZA 等^[66]和欧洲食品与饲料菌种协会(European Food & Fermentation Cultures Association, EFFCA)^[67]先后提出了基于决策树模型的食品用菌种安全性评价流程,该评价流程也成为目前应用分级分类管理理念开展食品用菌种安全性评价的依据,具体可见图 1。两者均建议引入适宜的分子生物学方法完成菌种的精确鉴定,并考虑抗生素耐药性、有毒化合物和毒力因子引起的安全问题^[66-67]。EFFCA 还提出要根据该菌种是否在 QPS 名单和已有研究等综合判定预期用途的安全性。此外,早在

2011 年 EFSA 就发布了《拟用于食品和饲料的遗传修饰微生物及其产物的风险评估指南》,其分类评价的关键也是根据产品本身的安全性,同时结合产品的纯度、化学组成、是否存在遗传修饰微生物成分以及是否含有活菌等开展分级分类管理^[68]。

2022 年,美国药典也发布了有益生作用的菌种安全性评价的关键指标,并将其分为基本指标和额外指标^[8]。基本指标包括 WGS 分析、AMR 测定和潜在可发生转移的耐药基因/元件的评价、安全使用历史(属、种和株水平);额外指标(即其他安全数据)主要为 D-乳酸的产生能力、黏蛋白降解活性、毒理学研究、追踪安全终点的人体临床研究和生物胺产生等。美国药典认为,对该类菌的安全性评价,不能一概而论,要根据其存在状况和安全使用历史开展分级分类评估^[8]。此外,考虑到按用途可将食品用菌种分为两大类,一是用于工业发酵生产酶制剂、氨基酸等食品原料的微生物,二是直接经口摄入的微生物。因此,其安全性评价技术和方案的选择也需根据实际使用场景制定^[66-68]。对于前者来说,必须对菌种在不同发酵条件下可能产生的有毒次级代谢产物进行严格监控,同时开展形态学、WGS 和动物致病性实验(如有必要)等^[5-8,66-68]。对于后者来说,除前面提到的基本实验,应开展更加全面的安全性评价实验,如耐药性、毒力特征如黏蛋白降解、溶血活性、生物胺生成能力、血小板聚集诱导作用、明胶酶活性、肠道有害酶活性、核酸酶活性、毒素生成能力、体外细胞毒性和基因毒性测定,活菌的动物致病性实验,以及有代表性的特定疾病动物模型研究和基于人群的临床研究等^[5-8]。

2 对我国监督管理的启发

我国微生物资源丰富,大量有价值的菌种资源亟需开发和利用。近年来,我国政府已初步建立了较为完善的食品用菌种管理制度,但考虑到新菌种的不断开发和新发风险的不断涌现,以及越来越多的遗传修饰微生物及其生产的产品被用于新食品原料的开发,迫使我们亟需借鉴国内外食品用菌种安全性评价的新技术、新方法和新理念用于我国食品用菌种安全性评价检测方法体系的建立和规范化管理。因此,总体来说,国内外食品用菌种安全性评价的新技术、新方法和新理念对我国监督管理的启发主要包括以下 5 个方面:

2.1 形成我国食品用菌种名单并构建分级分类管理体系

参考欧盟 QPS 名单或美国 FDA 的 GRAS 名单,结合我国食品用菌种的实际使用情况和申报情况,

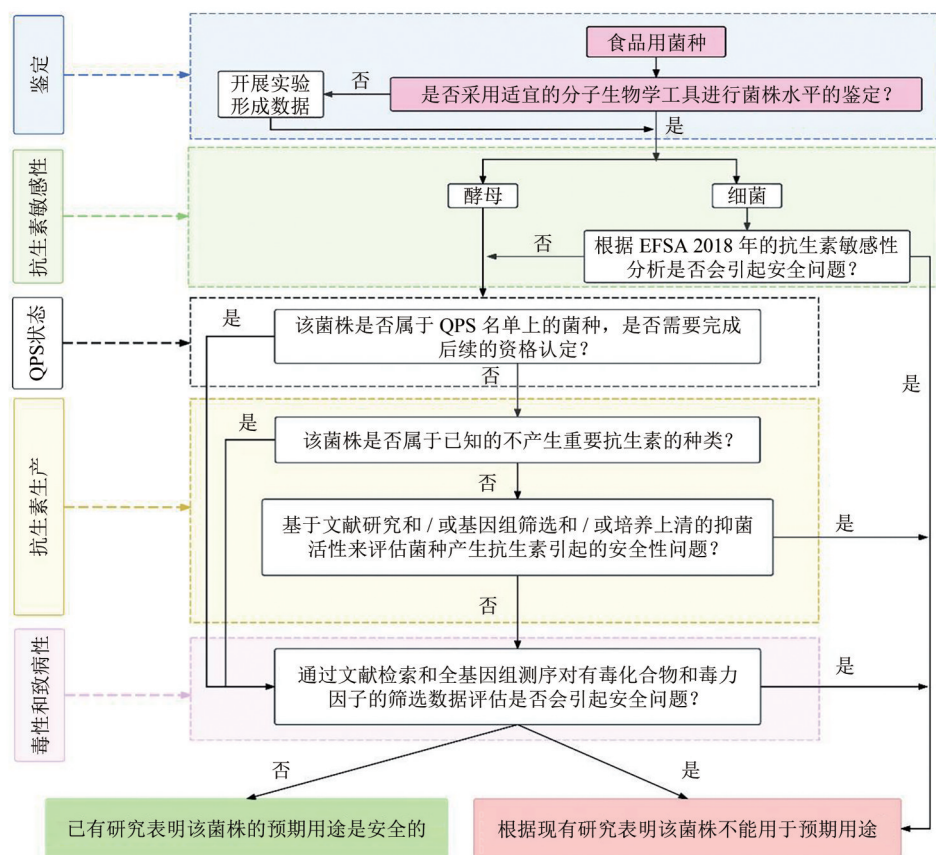


图1 食品用菌种安全性评价的决策树模型

Figure 1 Decision tree model for safety evaluation of food cultures

系统梳理并形成我国食品用菌种名单。在此基础上,按菌种具体用途引入分级分类管理理念,开展分级分类管理并制定不同类型的安全性评价方案,形成中国特色的管理体系。

2.2 实施动态监测和更新的菌种名单制度

根据全球食品用菌种安全性研究的最新进展,结合不同国家和国际组织已发布或更新的菌种名单,对已进入我国名单的菌种进行跟踪和再评估。同时根据最新研究进展和申报情况,及时纳入经科学验证、功效明确且安全的新菌种,确保名单的时效性和准确性。

2.3 建立与食品用菌种相配套的菌种实体库和基因组数据库

建议相关部门根据发布的食品用菌种名单,牵头构建我国食品用菌种实体标本库和基因组数据库,主要用于规范行业的菌种资源,开展菌种资源的监督管理和复核保藏。

2.4 研发新技术新方法用于新发风险的挖掘以及传统与新发风险的联合精准评价

在传统动物试验的基础上,引入多组学联合分析、替代毒理学、人工智能以及临床(前)研究等新技术、新方法等,挖掘新发风险并研发构建新技术新方法用于食品用菌种含遗传修饰微生物的传统

和新发风险的联合精准评价。

2.5 助力遗传修饰微生物及相关产品的安全性审批及应用

在最新发布的《食品加工用遗传修饰微生物安全性评价申报材料要求(试行)》的基础上,进一步推进食品工业用遗传修饰微生物及相关产品的安全性审批及应用,搭建起良好的衔接机制与支撑能力强的决策咨询团队,协同有关部门不断提升遗传修饰微生物的科学管理,引导和促进行业资源的高质量研发应用。

3 总结

我国食品用菌种行业快速高效的发展和精准高效的监督管理,不仅需要政产学研多方协力,建立一套科学严谨的安全性评价程序并开展分级分类管理;还需引入组学、替代毒理学、人工智能、临床研究等新技术新方法用于新发和潜在风险的挖掘与分析。截至目前,为促进食品用菌种行业的健康发展,近几年我国多个政府部门已做了大量工作。如国家卫生健康委员会(以下简称“国家卫生健康委”)在2022年8月18日发布了《可用于食品的菌种名单》和《可用于婴幼儿的菌种名单》更新公告^[69]。此外,按照国家卫生健康委和农业农村部的相

关要求,国家食品安全风险评估中心于2024年9月13日发布了《关于完善“三新食品”安全性评价资料要求的通知》,该通知中明确规定了对符合“三新食品”申报条件的、生产加工过程中涉及遗传修饰微生物的产品,应该按《食品加工用遗传修饰微生物安全性评价申报材料要求(试行)》进行申报材料的递交^[70]。相信未来在政产学研多方助力下,国内外食品用菌种安全性评价的新技术、新方法和新理念将逐步用于我国新菌种的开发和新发风险的挖掘,并将会助力我国食品用菌种行业的健康发展。

参考文献

- [1] 中国政府网_中华人民共和国中央人民政府. 树立和践行大食物观[EB/OL]. (2024-05-13)[2024-09-01]. https://www.gov.cn/yaowen/liebiao/202405/content_6950671.htm.
The State Council _ The People's Republic of China. Establishing and practicing the concept of big food[EB/OL]. (2024-05-13)[2024-09-01]. https://www.gov.cn/yaowen/liebiao/202405/content_6950671.htm.
- [2] 中国政府网_中华人民共和国中央人民政府. 国务院办公厅关于践行大食物观构建多元化食物供给体系的意见[EB/OL]. (2024-09-12)[2024-09-16]. https://www.gov.cn/yaowen/liebiao/202409/content_6974842.htm.
The State Council _ The People's Republic of China. Opinions of the General Office of the State Council on practicing the big food concept and establishing a diversified food sharing system[EB/OL]. (2024-09-12)[2024-09-16]. https://www.gov.cn/yaowen/liebiao/202409/content_6974842.htm.
- [3] 中国政府网_中华人民共和国中央人民政府. 中共中央 国务院关于做好2023年全面推进乡村振兴重点工作的意见[EB/OL]. (2023-02-13)[2024-09-01]. https://www.gov.cn/zhengce/2023-02/13/content_5741370.htm.
The State Council _ The People's Republic of China. Opinions of the General Office of the State Council on doing a good job in key work of comprehensive rural revitalization in 2023[EB/OL]. (2023-02-13)[2024-09-01]. https://www.gov.cn/zhengce/2023-02/13/content_5741370.htm.
- [4] European Food & Fermentation Cultures Association (EFFCA). Definition of Food Cultures[EB/OL](2023-03-22)[2024-09-01]. <https://effca.org/publications/effca-paper-on-the-definition-of-food-cultures-2023-update>.
- [5] SALMINEN S, COLLADO M C, ENDO A, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18: 649-666.
- [6] MERENSTEIN D, POT B, LEYER G, et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives[J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2185034.
- [7] NATARAJ B H, BWHARE P V, YADAV H, et al. Emerging pre-clinical safety assessments for potential probiotic strains: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 11: 1-29.
- [8] ROE A L, BOYTE M-E, ELKINS C A, et al. Considerations for determination safety of probiotics: A USP perspective[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2022, 136: 105266.
- [9] ZEGARRA-RUIZ D F, BEIDAQ A E, IÑIGUEZ A J, et al. A diet-sensitive commensal lactobacillus strain mediates TLR7-dependent systemic autoimmunity[J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 925(1): 113-127.
- [10] GLEESON P J, BENECH N, CHEMOUNY J, et al. The gut microbiota post translationally modifies IgA1 in autoimmune glomerulonephritis[J]. *Science Translational Medicine*, 2024, 16(740): eadl6149.
- [11] SHELLEY E B, O' ROURKE D, GRANT K, et al. Infant botulism due to *C. butyricum* type E toxin: a novel environmental association with pet terrapins[J]. *Epidemiology and Infection*, 2015, 143(3): 461-469.
- [12] EFSA. EFSA scientific colloquium 24- 'omics in the risk assessment: state of the art and next steps[J]. EFSA Supporting Publication, 2018: EN-1512.
- [13] BESTEN H M W, AMEZQUITA A, BOVER-CID S, et al. Next generation of microbiological risk assessment: potential of omics data for exposure assessment[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 287(10): 18-27.
- [14] KWOJI L D, AIYEGORO O A, OKPEKU M, et al. 'Multi-omics' data integration: applications in probiotics studies[J]. *Npj Science of Food*, 2023, 25: 1-7.
- [15] EFSA. EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganism intentionally used in the food chain[J]. EFSA Journal, 2024.
- [16] EFSA Panel on Biological Hazards, KOOUTSOUMANIS K, ALLENDE A, et al. Statement on how to interpret the QPS qualification on 'acquired antimicrobial resistance genes'[J]. EFSA Journal, 2023, 21(10): 1-13.
- [17] PEL H J, WINDE JH D, ARCHER D B, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(2): 221-31.
- [18] YANG Y, LIU B, DU X J, et al. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8331.
- [19] NICOLOFF H, PERRETEN V, LEVY S B. Increased genome instability in *Escherichia coli* lon mutants: Relation to emergence of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants caused by insertion sequence elements and large tandem genomic amplifications[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(4): 1293-303.
- [20] KERGOURLAY G, TAMINIAU B, DAUBE G, et al. Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 213: 31-39.
- [21] SANTOS F B, VOS W M, TEUSINK B. Towards metagenome-scale models for industrial applications—the case of Lactic Acid Bacteria[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(2): 200-206.
- [22] 刘文虎, 柴丽娟, 张立强, 等. 基于宏基因组学解析不同质量等级中温大曲微生物组的异质性[J]. *微生物学报*, 2023,

- 63(11): 4383-4398.
- LIU W H, CHAI L J, ZHANG L Q, et al. Metagenomics unveils the microbiome heterogeneity of medium-temperature Daqu with different quality grades[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(11): 4383-4398.
- [23] LEEUWENDAAL N K, STANTON C, O'TOOLE P W, et al. Fermented foods, health and the gut microbiome[J]. *Nutrients*, 2022, 14(7): 1527.
- [24] WANG J C, ZHANG J C, LIU W J, et al. Metagenomic and metatranscriptomic profiling of *Lactobacillus casei* Zhang in the human gut[J]. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2021, 7(1): 55.
- [25] CARLINO N, BLANCO-MIGUEZ A, PUNCOCHAR M, et al. Unexplored microbial diversity from 2500 food metagenomes and links with the human microbiome[J]. *Cell*, 2024, 187(20): 1-21.
- [26] ENDO K, MINE Y, SHUTO T, et al. Comprehensive analysis of transcriptional profiles in oral epithelial-like cells stimulated with oral probiotic *Lactobacillus* spp.[J]. *Archives of Oral Biology*, 2020, 118: 104832.
- [27] GARCÍA, E A, BENOMAR N, LERMA L L, et al. Changes in resistome profile of potential probiotic *Lactiplantibacillus pentosus* in response to edible oil adaptation[J]. *Food Microbiology*, 2023, 109: 104148.
- [28] ENDO K, MINE Y, SHUTO T, et al. Comprehensive analysis of transcriptional profiles in oral epithelial-like cells stimulated with oral probiotic *Lactobacillus* spp.[J]. *Archives of Oral Biology*, 2020, 118: 104832.
- [29] AN H, DOUILLARD F P, WANG G, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the bile stress response in a centenarian-originated probiotic *Bifidobacterium longum* BBMN68[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*; MCP, 2014, 13(10): 2558-72.
- [30] 韩小敏, 张靖, 韩春卉, 等. 产B类伏马菌素黑曲霉菌株基因水平鉴定研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(2): 105-110.
- HAN X M, ZHANG J, HAN C H, et al. Genetic identification of B-type fumonisin-producing *Aspergillus niger* [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, 26(2): 105-110.
- [31] MUÑOZ M, BENOMAR N S, ENNAHAR S, et al. Comparative proteomic analysis of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 222: 8-15.
- [32] ADAV S S, LI A A, MANAVALAN A, et al. Quantitative iTRAQ secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes[J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(8): 3932-3940.
- [33] SICILIANO R A, LIPPOLIS R, MAZZEO M F. Proteomics for the investigation of surface-exposed proteins in probiotics[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2019, 6: 52.
- [34] BOŽIČ J T, BUTINAR L, MARUŠIČ M B, et al. Determination of biogenic amines formation by autochthonous lactic acid bacteria from 'Refošk' grapes using different analytical methods [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 156: 112908.
- [35] BIANCHI L, LAGHI L, CORREANI V, et al. A combined proteomics, metabolomics and *in vivo* analysis approach for the characterization of probiotics in large-scale production [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 157.
- [36] YE D Y, LI X W, SHEN J Z, et al. Microbial metabolomics: from methods to translational applications [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, 148: 116540.
- [37] SAKIHAMA Y, HIDESE R, HASUNUMA T, et al. Increased flux in acetyl-CoA synthetic pathway and TCA cycle of *Kluyveromyces marxianus* under respiratory conditions [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 5319.
- [38] YANG D Y, YANG H, SHI M Y, et al. Advancing food safety risk assessment in China: development of new approach methodologies (NAMs)[J]. *Frontiers of Toxicology*, 2023, 17(5): 1292373.
- [39] FAGERLUND A, LINDBECK T, STORSET A K, et al. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia [J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 3): 693-704.
- [40] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed, YCHEN G, AQUILINA G, et al. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms[J]. *EFSA Journal*, 16(3):5206.
- [41] MESSAOUDI S, MADI A, PREVOST H, et al. *In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51[J]. *Anerobe*, 2012, 18(6): 584-589.
- [42] ZHOU C, ZHANG Y Y, BASSEY A, et al. Expansion of intestinal secretory cell population induced by *Listeria monocytogenes* infection: Accompanied with the inhibition of NOTCH pathway [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 53(10): 1471-1482.
- [43] Advancing Alternative Methods at FDA. [EB/OL]. (2023-11-14) [2024-09-01]. <https://www.fda.gov/science-research/about-science-research-fda/advancing-alternative-methods-fda>.
- [44] OECD. OECD series on testing and assessment. [EB/OL] (2024-12-15) [2024-12-21] https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-testing-and-assessment_20777876.
- [45] HE X, YU J, WANG M, et al. Bap180/Baf180 is required to maintain homeostasis of intestinal innate immune response in *Drosophila* and mice[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17056.
- [46] LARYSA B, SAMUEL K, HELENA B. *Galleria mellonella*- a model for the study of aPDT-prospects and drawbacks [J]. *Microorganisms*, 2023, 11: 1455.
- [47] ZHANG Y. Effect of *L.acidophilus* JCM1132 on immune function of Zebrafish (*Danio rerio*) offspring [J]. *Biology, Environmental Science*, 2013.
- [48] 程树军. 动物实验替代技术研究进展[J]. *科技导报*, 2017, 35(24):4 0-47.
- CHENG S J. Technology progress of alternative to animal testing [J]. *Science and Technology Review*, 2017, 35(24): 40-47.
- [49] RAIES A B, BAJIC V B. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews Computational Molecular Science*, 2016, 6(2): 147-172.
- [50] Toxtree: Toxic Hazard Estimation by decision tree approach. 3.2.0-SNAPSHOT [EB/OL]. (2018-12-31) [2024-09-01]. <https://toxtree.sourceforge.net/>.

- [51] DENG X, CAO S H, HORN A L. Emerging applications of machine learning in food safety[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2021, 12(1): 513-538.
- [52] LUPOLOVA N, DALLMAN T J, MATTHEWS L, et al. Support vector machine applied to predict the zoonotic potential of *E. coli* O157 cattle isolates[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2016, 113(40): 11312-17.
- [53] SUN Y, LI H, ZHENG L, et al. iProbiotics: a machine learning platform for rapid identification of probiotic properties from whole-genome primary sequences[J]. Briefing Bioinformatics, 2022, 23(1): bbab477.
- [54] WU S F, FENG T, TANG W, et al. metaProbiotics: a tool for mining probiotic from metagenomic binning data based on a language model[J]. Briefing Bioinformatics, 2024, 25(2): bbae085.
- [55] Food Safety Authority of Ireland. Assessment of the safety of “probiotic” in food supplements [EB/OL]. (2024-07-08) [2024-09-16]. <https://www.fsai.ie/publications/assessment-of-the-safety-of-probiotics%E2%80%9D-in-food-su>.
- [56] ROUSSEAU C F, DEVIGNES, C, KLING F, et al. Microbiome product toxicology: regulatory view on translational challenges [J]. Regulatory Toxicology, 2020: 1-29.
- [57] LIONG M T. Safety of probiotics: translocation and infection[J]. Nutrition Reviews, 2008, 66(4): 192-202.
- [58] SANDERS, M E, MERENSTEIN D J, OUWEHAND A C, et al. Probiotic use in at-risk populations [J]. Journal of American Pharmaceutical Association, 2016, 56(6): 680-686.
- [59] 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.
- [60] PRADHAN D, R SINGH, A TYAGI, et al. Assessing the safety and efficacy of *Lactobacillus plantarum* MTCC 5690 and *Lactobacillus fermentum* MTCC 5689 in colitis mouse model [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11(3): 910-20.
- [61] 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): 102-14.
- [62] HEMPEL S, NEWBERRY S, SHEKELLE P, et al. Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease [J]. Evidence Report/Technology Assessment, 2011, 200: 1-645.
- [63] United States Food and Drug Administration (US FDA). Good clinical practices, [EB/OL]. (2024-05-13) [2024-09-01]. Available at: <https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/good-clinical-practice>.
- [64] CHAN A W, TETZLAFF J M, ALTMAN D G, et al. SPIRIT 2013 statement: defining standard protocol items for clinical trials[J]. Annals of Internal Medicine, 2013, 158(3): 200-207.
- [65] IOANNIDIS J P A, EVANS S J W, GÓTZSCHE P C, et al. Better reporting of harms in randomized trials: an extension of the CONSORT statement [J]. Annals of Internal Medicine, 2004, 141(10): 781-788.
- [66] PARIZA M W, GILLIES K O, KRAAK-RIPPLE S F, et al. Determining the safety of microbial cultures for consumption by humans and animals [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2015, 73: 164-171.
- [67] EFFCA. Safety assessment and characterization of food cultures [M]. 2023.
- [68] EFSA Panel on Genetically Modified Organisms. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use [J]. EFSA Journal, 2011, 9(6): 2193.
- [69] 中华人民共和国国家卫生健康委员会_食品安全标准与监测评估司. 关于《可用于食品的菌种名单》和《可用于婴幼儿食品的菌种名单》更新的公告 [EB/OL]. (2022-08-25) [2024-09-01]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202208/1d6c229d6f744b35827e98161c146afb.shtml>.
- National Health Commission of the People's Republic of China_Food Safety Standards and Monitoring Evaluation Department. Announcement on the update of “the list of strains used for food” and “list of strains used for infant and young children's food” [EB/OL]. (2022-08-25) [2024-09-01]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202208/1d6c229d6f744b35827e98161c146afb.shtml>.
- [70] 国家食品安全风险评估中心. 关于完善“三新食品”安全性评价资料要求的通知 [EB/OL]. (2024-09-13) [2024-09-16]. <https://cfsa.net.cn/zxdt/tzgg/2024/14077.shtml>.
- China National Center for Food Safety Risk Assessment. Notice on Improving the Requirements for Safety Evaluation Materials of “Three New Foods” [EB/OL]. (2024-09-13) [2024-09-16]. <https://cfsa.net.cn/zxdt/tzgg/2024/14077.shtml>.