



样品润肠通便功效检测报告

项目编号：5908

委托单位：君乐宝乳业集团有限公司

报告日期：2023 年 04 月 21 日

声 明

- 1、本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。
- 2、本报告未盖本单位公章无效。
- 3、本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位公章无效。
- 4、委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。
- 5、本单位接收的委托送检样品，其代表性、真实性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

目 录

样品信息	1
判定标准	1
检测结论	2
检测项目 1：润肠通便功效	3
1. 检测材料	3
1.1. 样品配制信息	3
1.2. 实验动物	3
1.3. 仪器、耗材与试剂	3
2. 检测方法	4
2.1. MTC 测定	4
2.2. 润肠通便功效评价	4
3. 检测结果	4
3.1. MTC	4
3.2. 润肠通便功效评价	5
检测项目 2：肠道定植	8
1. 检测材料	8
1.1. 样品配制信息	8
1.2. 实验动物	8
1.3. 仪器、耗材与试剂	8
2. 检测方法	8
2.1. 肠道定植	8
3. 检测结果	9
3.1. 肠道定植	9
检测人员及分工	11
检测单位信息	11
委托单位信息	11

样品信息

样品名称	君乐宝开菲尔 K-10 菌粉	颜色和物态	白色粉末
样品规格及数量	5 g/袋 × 1 袋	收样日期	2023.03.06
生产日期或批号	/	失效日期	/
储存条件	冷冻、干燥、避光	检测完成日期	2023.04.11
检测项目	润肠通便、肠道定植		

样品名称	君乐宝 K-10 开菲尔风味发酵乳	颜色和物态	白色液体
样品规格及数量	100 mL/瓶 × 3 瓶	收样日期	2023.04.03
生产日期或批号	/	失效日期	/
储存条件	冷藏、干燥、避光	检测完成日期	2023.04.11
检测项目	润肠通便		

样品名称	君乐宝开菲尔 K-10 菌粉	颜色和物态	白色粉末
样品规格及数量	约 20 g/袋 × 1 袋	收样日期	2023.04.03
生产日期或批号	/	失效日期	/
储存条件	冷冻、干燥、避光	检测完成日期	2023.04.11
检测项目	润肠通便		

样品名称	原味风味酸牛奶（复原乳）	颜色和物态	白色乳液
样品规格及数量	150 g/袋 × 1 袋	收样日期	2023.04.03
生产日期或批号	/	失效日期	/
储存条件	冷藏、干燥、避光	检测完成日期	2023.04.11
检测项目	润肠通便		

判定标准

具有功效（ $p < 0.05$ 差异具有统计学意义）。

检测结论

在本实验条件下，由君乐宝乳业集团有限公司提供的原味风味酸牛奶（复原乳）、君乐宝 K-10 开菲尔风味发酵乳、君乐宝开菲尔 K-10 菌粉和君乐宝开菲尔 K-10 菌粉（活化）均具有润肠通便功效。君乐宝开菲尔 K-10 菌粉能在斑马鱼肠道定植，有效定植时间为 24 h。本实验中斑马鱼 3.12、6.25 和 12.5 mg/mL 分别相当于人每日服用君乐宝 K-10 开菲尔风味发酵乳 56.2、112 和 225 g（仅供参考）。

（本检测报告仅对接收样品的测试结果负责）

检测项目 1：润肠通便功效

1. 检测材料

1.1. 样品配制信息

君乐宝开菲尔 K-10 菌粉，MRS 肉汤培养基培养，用比浊仪计数，用标准稀释水稀释至 2.02×10^8 CFU/mL，现配现用。

君乐宝开菲尔 K-10 菌粉，该菌粉为益生菌和益生元的混合物，用比浊仪计数，用标准稀释水稀释至 2.02×10^8 CFU/mL，现配现用。

君乐宝 K-10 开菲尔风味发酵乳，使用标准稀释水配制成 200 mg/mL 母液，现配现用。

原味风味酸牛奶（复原乳），使用标准稀释水配制成 200 mg/mL 母液，现配现用。

阳性对照：派立清口服液（以下简称派立清），褐色液体，批号 22J08ABH01，无限极（中国）有限公司，阴凉柜储存。吸取原液，按需加入。

1.2. 实验动物

斑马鱼均饲养于 28°C 的养鱼用水中（水质：每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐，电导率为 450~550 μ S/cm；pH 为 6.5~8.5；硬度为 50~100 mg/L CaCO_3 ），由本公司养鱼中心繁殖提供，实验动物使用许可证号为：SYXK（浙）2022-0004，饲养管理符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。

野生型 AB 品系斑马鱼，以自然成对交配繁殖方式进行。年龄为受精后 5 天（5 dpf）的斑马鱼用于样品润肠通便功效最大检测浓度（MTC）测定及其功效评价。

1.3. 仪器、耗材与试剂

解剖显微镜（SZX7, OLYMPUS, Japan）；CCD 相机（VertA1, 上海土森视觉科技有限公司, China）；电动聚焦连续变倍荧光显微镜（AZ100, Nikon, Japan）；精密电子天平（CP214, OHAUS, USA）；比浊仪（DENSI CHEK PLUS, 生物梅里埃公司, France）；6 孔板（浙江贝兰伯生物科技有限公司, China）。

甲基纤维素（批号C2004046，上海阿拉丁生化科技股份有限公司，China）；
尼罗红（批号SLBP9326V，Sigma，India）。

2. 检测方法

2.1. MTC 测定

随机选取 5 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼，水溶给予尼罗红作为肠内容物的荧光指示剂，喂饲 16 h 后将斑马鱼随机分配至 6 孔板中，每孔（实验组）均处理 30 尾斑马鱼。水溶给予样品（浓度见表 1-1），同时设置正常对照组，每孔容量为 3 mL。28°C 处理 48 h 后，测定样品对正常斑马鱼的 MTC。

2.2. 润肠通便功效评价

随机选取 5 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼，水溶给予尼罗红作为肠内容物的荧光指示剂。喂饲 16 h 后将斑马鱼随机分配至 6 孔板中，每孔（实验组）均处理 30 尾斑马鱼。水溶给予样品（浓度见表 1-2），阳性对照派立清 5.00 $\mu\text{L/mL}$ 浓度（根据人服用剂量换算），同时设置正常对照组，每孔容量为 3 mL。28°C 处理 48 h 后，每组随机选取 10 尾斑马鱼在荧光显微镜下拍照并保存图片，用 NIS-Elements D 3.20 高级图像处理软件分析并采集数据，分析斑马鱼肠道荧光强度，以该指标统计学分析结果评价样品润肠通便功效。统计学处理结果采用 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示。用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析， $p < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3. 检测结果

3.1. MTC

在本实验条件下，君乐宝开菲尔 K-10 菌粉润肠通便功效的 MTC 为 0.125 mg/mL (2.02×10^8 CFU/mL)，君乐宝 K-10 开菲尔风味发酵乳润肠通便功效的 MTC 为 12.5 mg/mL。详见表 1-1。

表 1-1. 样品润肠通便功效浓度摸索实验结果 (n = 30)

组别	浓度 (mg/mL)	斑马鱼计数 (CFU/mL)	死亡数 (尾)	死亡率 (%)	表型
正常对照组			0	0	未见明显异常

组别	浓度 (mg/mL)	斑马鱼计数 (CFU/mL)	死亡数 (尾)	死亡率 (%)	表型
君乐宝开啡 尔 K-10 菌 粉	0.031	5.06×10^7	0	0	与正常对照组状态相似
	0.062	1.01×10^8	0	0	与正常对照组状态相似
	0.125	2.02×10^8	0	0	与正常对照组状态相似
	0.250	4.05×10^8	3	10	较正常对照组状态差
	0.500	8.10×10^8	7	23	-
君乐宝 K-10 开啡尔风味 发酵乳	3.12	-	0	0	与正常对照组状态相似
	6.25	-	0	0	与正常对照组状态相似
	12.5	-	0	0	与正常对照组状态相似
	25.0	-	13	43	-
	50.0	-	30	100	-

3.2. 润肠通便功效评价

在本实验条件下，阳性对照组派立清 5.00 $\mu\text{L/mL}$ 斑马鱼肠道荧光强度 (647313 ± 13516 像素) 与正常对照组 (884961 ± 21975 像素) 比较有显著减小 ($p < 0.001$)，说明在 5.00 $\mu\text{L/mL}$ 浓度条件下，派立清具有润肠通便功效。

原味风味酸牛奶(复原乳) 12.5 mg/mL 浓度时，斑马鱼肠道荧光强度 (74438 ± 4028 像素) 与正常对照组 (884961 ± 21975 像素) 比较有显著减小 ($p < 0.001$)，说明在 12.5 mg/mL 浓度条件下，原味风味酸牛奶(复原乳) 具有润肠通便功效。

君乐宝 K-10 开啡尔风味发酵乳在 3.12、6.25 和 12.5 mg/mL 浓度时斑马鱼肠道荧光强度分别为 213519 ± 23169 、 63836 ± 2562 和 63406 ± 1737 像素，与正常对照组 (884961 ± 21975 像素) 比较，3.12 mg/mL 浓度组斑马鱼肠道荧光强度无显著差异 ($p > 0.05$)，6.25 和 12.5 mg/mL 浓度组斑马鱼肠道荧光强度均有显著减小 ($p < 0.001$ & $p < 0.001$)。说明在 6.25 和 12.5 mg/mL 浓度条件下，君乐宝 K-10 开啡尔风味发酵乳具有润肠通便功效。

君乐宝开啡尔 K-10 菌粉在 2.02×10^8 CFU/mL 浓度时斑马鱼肠道荧光强度 (771970 ± 27427 像素) 与正常对照组 (884961 ± 21975 像素) 比较有显著减小 ($p < 0.01$)，说明在 2.02×10^8 CFU/mL 浓度条件下，君乐宝开啡尔 K-10 菌粉具有润肠通便功效。

君乐宝开啡尔 K-10 菌粉(活化)在 5.05×10^7 、 1.01×10^8 和 2.02×10^8 CFU/mL

浓度时斑马鱼肠道荧光强度分别为 816608 ± 16729 、 772133 ± 24695 和 743664 ± 33895 像素，与正常对照组 (884961 ± 21975 像素) 比较， 5.05×10^7 CFU/mL 浓度组斑马鱼肠道荧光强度无显著差异 ($p > 0.05$)， 1.01×10^8 和 2.02×10^8 CFU/mL 浓度组斑马鱼肠道荧光强度均有显著减小 ($p < 0.01$ & $p < 0.001$)。说明在 1.01×10^8 和 2.02×10^8 CFU/mL 浓度条件下，君乐宝开菲尔 K-10 菌粉 (活化) 具有润肠通便功效。

君乐宝开菲尔 K-10 菌粉 (活化) 2.02×10^8 CFU/mL 浓度组 (743664 ± 33895 像素) 与君乐宝开菲尔 K-10 菌粉 2.02×10^8 CFU/mL 浓度组 (771970 ± 27427 像素) 比较无显著差异 ($p > 0.05$)，说明君乐宝开菲尔 K-10 菌粉润肠通便功效与活化后的 K-10 菌功效相当。

君乐宝 K-10 开菲尔风味发酵乳 12.5 mg/mL 浓度组 (63406 ± 1737 像素) 与原味风味酸牛奶 (复原乳) 12.5 mg/mL 浓度组 (74438 ± 4028 像素) 比较有显著性差异 ($p < 0.05$)，说明君乐宝 K-10 开菲尔风味发酵乳润肠通便功效优于原味风味酸牛奶 (复原乳)；与君乐宝开菲尔 K-10 菌粉和君乐宝开菲尔 K-10 菌粉 (活化) 2.02×10^8 CFU/mL 浓度组 (771970 ± 27427 & 743664 ± 33895 像素) 比较有显著性差异 ($p < 0.001$)，说明君乐宝 K-10 开菲尔风味发酵乳显著优于君乐宝开菲尔 K-10 菌粉和活化后的君乐宝开菲尔 K-10 菌粉。

详见表 1-2、图 1-1、图 1-2 和图 1-3。

表 1-2. 样品润肠通便功效评价实验结果 (n = 10)

组别	浓度 (mg/mL)	斑马鱼肠道荧光强度 (像素, mean $\pm$ SE)
正常对照组	-	884961 ± 21975
派立清	5.00 μ L/mL	$647313 \pm 13516^{***}$
原味风味酸牛奶 (复原乳)	12.5	$74438 \pm 4028^{***\$}$
君乐宝 K-10 开菲尔风味发酵乳	3.12	213519 ± 23169
	6.25	$63836 \pm 2562^{***}$
	12.5	$63406 \pm 1737^{***}$
君乐宝开菲尔 K-10 菌粉	2.02×10^8 CFU/mL	$771970 \pm 27427^{***\$\$}$
君乐宝开菲尔 K-10 菌粉 (活化)	5.05×10^7 CFU/mL	816608 ± 16729

组别	浓度 (mg/mL)	斑马鱼肠道荧光强度 (像素, mean ± SE)
	1.01×10^8 CFU/mL	$772133 \pm 24695^{**}$
	2.02×10^8 CFU/mL	$743664 \pm 33895^{***\$}$

与正常对照组比较 (多组间), $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$

与君乐宝 K-10 开啡尔风味发酵乳比较, $^{\$}p < 0.05$, $^{$$$}p < 0.001$

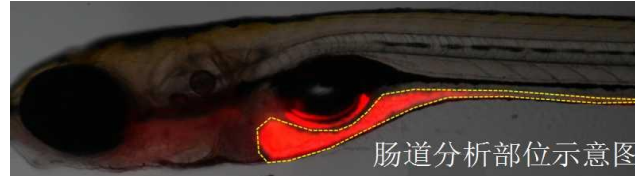


图 1-1. 样品处理后斑马鱼肠道荧光强度分析示意图

注: 黄色虚线区域为斑马鱼肠道分析部位

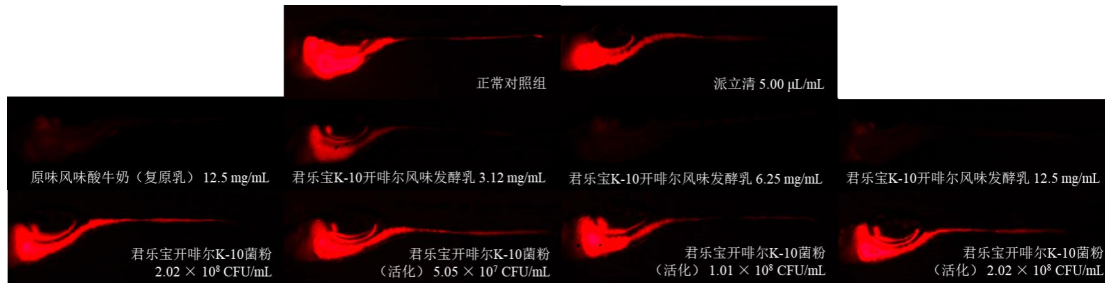


图 1-2. 样品处理后斑马鱼肠道荧光强度典型图

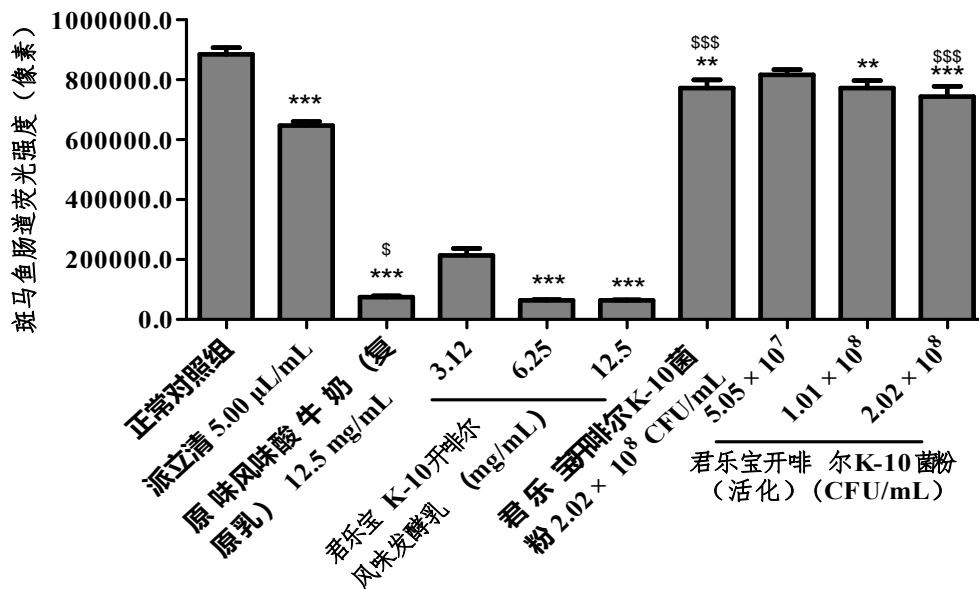


图 1-3. 样品处理后斑马鱼肠道荧光强度

与正常对照组比较, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$; 与原味风味酸牛奶 (复原乳) 比较, $^{\$}p < 0.05$, $^{$$$}p < 0.001$

检测项目 2：肠道定植

1. 检测材料

1.1. 样品配制信息

君乐宝开啡尔 K-10 菌粉，用比浊仪计数，用标准稀释水稀释至 2.02×10^8 CFU/mL，现配现用。

1.2. 实验动物

斑马鱼均饲养于 28°C 的养鱼用水中（水质：每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐，电导率为 450~550 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ；pH 为 6.5~8.5；硬度为 50~100 mg/L CaCO_3 ），由本公司养鱼中心繁殖提供，实验动物使用许可证号为：SYXK（浙）2022-0004，饲养管理符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。

野生型 AB 品系斑马鱼，以自然成对交配繁殖方式进行。年龄为 5 dpf 的斑马鱼用于君乐宝开啡尔 K-10 菌粉肠道定植情况评价。

1.3. 仪器、耗材与试剂

解剖显微镜（SZX7, OLYMPUS, Japan）；CCD 相机（VertA1, 上海土森视觉科技有限公司, China）；电动聚焦连续变倍荧光显微镜（AZ100, Nikon, Japan）；精密电子天平（CP214, OHAUS, USA）；比浊仪（DENSI CHEK PLUS, 生物梅里埃公司, France）；6 孔板（浙江贝兰伯生物科技有限公司, China）。

甲基纤维素（批号 C2004046, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, China）；DIO（批号 2174897, 赛默飞世尔科技（中国）有限公司, China）。

2. 检测方法

2.1. 肠道定植

使用 DIO 绿色荧光标记君乐宝开啡尔 K-10 菌，随机选取 5 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼于 6 孔板中，每孔（实验组）均处理 30 尾斑马鱼。分别水溶给予君乐宝开

菲尔K-10菌粉 6.25×10^6 CFU/mL，每孔容量为3 mL。28°C处理24 h后，移除益生菌。28°C继续处理6、24和48 h后，每个实验组分别随机选择10尾斑马鱼置于荧光显微镜下进行观察、拍照并保存图片，用NIS-Elements D 3.20高级图像处理软件分析并采集数据，分析斑马鱼肠道荧光强度，以该指标的统计学分析结果评价样品肠道定植情况。统计学处理结果采用 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示。用SPSS26.0软件进行统计学分析， $p < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3. 检测结果

3.1. 肠道定植

在本实验条件下，君乐宝开菲尔 K-10 菌粉能在斑马鱼肠道定植，有效定植时间为 24 h。详见表 2-1、图 2-1、图 2-2 和图 2-3。

表 2-1. 君乐宝开菲尔 K-10 菌粉肠道定植实验结果 (n = 10)

组别	移除益生菌后时间 (h)	斑马鱼肠道荧光强度 (像素, $\text{mean} \pm \text{SE}$)
君乐宝开菲尔 K-10	0	483109 ± 22245
菌粉 6.25×10^6 CFU/mL	6	547368 ± 38005
	24	435252 ± 15089
	48	$365229 \pm 17637^{***}$

与 0 h 比较, $^{***}p < 0.001$

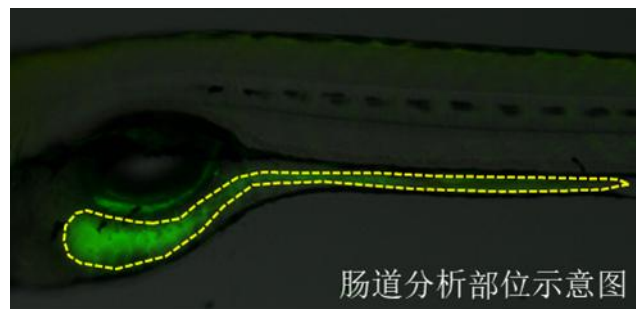


图 2-1. 样品处理后斑马鱼肠道荧光强度分析示意图

注：黄色虚线区域为斑马鱼肠道分析部位

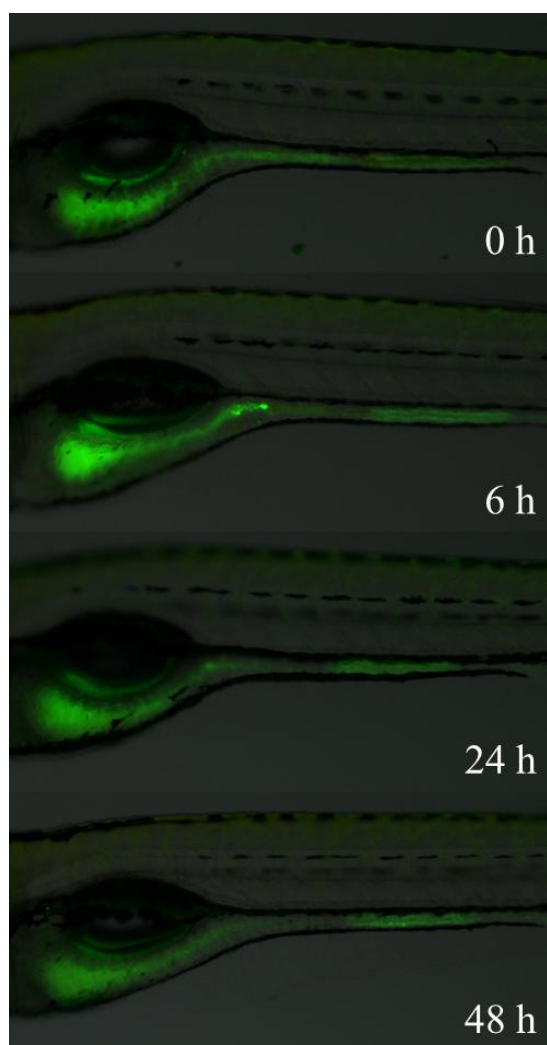
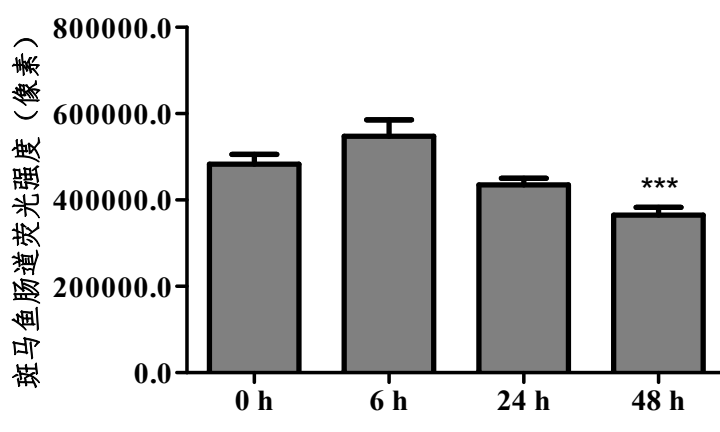


图 2-2. 君乐宝开啡尔 K-10 菌粉处理后斑马鱼肠道荧光强度典型图



君乐宝开啡尔 K-10 菌粉 6.25×10^6 CFU/mL

图 2-3. 君乐宝开啡尔 K-10 菌粉处理后斑马鱼肠道荧光强度

与 0 h 比较, *** $p < 0.001$

检测人员及分工

项目负责人：周佳丽（实验设计）

项目参与人员：毛滢雯（实验操作、数据分析和报告撰写）；肖克静（实验操作和数据复核）；刘仁燕（报告复核）

质量管理人員：俞航萍、朱家乐

检测单位信息

单位名称：杭州环特生物科技股份有限公司

单位地址：浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号 5 幢 A 区 1-2 楼

联系人：季俊鹏

电话：18351718320

E-mail: jjp@zhunter.com

委托单位信息

单位名称：君乐宝乳业集团有限公司

单位地址：河北省石家庄市鹿泉区君乐宝乳业技术研究院

联系人：王新潮

电话：13403109673

E-mail: /