

# 降胆固醇乳酸菌的筛选及其对小白鼠的不良影响

张开屏<sup>1</sup>, 田建军<sup>2\*</sup>

(1. 内蒙古商贸职业学院 食品工程系, 内蒙古 呼和浩特 010070; 2. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:** 对分离自内蒙古家庭传统发酵乳制品中的 14 株乳杆菌进行体外筛选。结果表明, 试验菌株均有降解 MRS-CHOL 培养基中胆固醇的能力, 对胆固醇的去除率在 6.84%~42.97%。其中 N59-1 试验菌株对胆固醇的去除率为 42.97% ( $P < 0.05$ )。经生理生化特性和 16S rDNA 部分序列分析, 菌株 N59-1 与标准菌株 *L.plantarum* 的同源性为 99.7%, N59-1 可被判定为 *L.plantarum*。30 d 喂养试验结果表明, 各组小鼠的组织生长发育及血液理化指标等与对照组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

**关键词:** 乳杆菌; 胆固醇; 16S rDNA; 急性毒性试验

中图分类号: TS 251.5 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)11—1222—06

## Screening of Cholesterol-Reducing *Lactobacillus* and Adverse Effects in Mice

ZHANG Kaiping<sup>1</sup>, TIAN Jianjun<sup>2\*</sup>

(1. Department of Food Engineering, Inner Mongolia Business Vocational College, Hohhot 010070, China;  
2. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** A total of 14 strains were screened that they initially isolated from homemade traditional fermented milk, which was sourced from Inner Mongolia, China. The results showed that all strains could remove cholesterol from culture medium of MRS-CHOL ( $P < 0.05$ ), and the percentage of Cholesterol-degrading rate ranged from 6.84% to 42.97%. Among them, strain N59-1 was selected after screening, which was based on their cholesterol removal abilities. The cholesterol removal rate was 42.97%. The strain N59-1 with the highest level of cholesterol removal from the media was identified using physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequences, the homology of N59-1 with *L. plantarum* was 99.7%. As a result N59-1 was named *L. plantarum*. 30 days feeding test results showed that the organ growth and blood biochemical index of mice in each group had no significant difference compared with the control group ( $P > 0.05$ ).

**Keywords:** *Lactobacillus*, cholesterol, 16S rDNA, acute toxicity experiment

收稿日期: 2013-12-11

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2012MS1214); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZZ12083; NJZC13407)。

作者简介: 张开屏(1977—), 女, 内蒙古包头人, 工学硕士, 讲师, 主要从事畜产品加工技术方面的研究。E-mail: zhangkaiping2005@163.com

\* 通信作者: 田建军(1975—), 男, 内蒙古乌兰察布人, 工学硕士, 副教授, 主要从事畜产品科学方面的研究。E-mail: imaut@163.com

乳酸菌是人体肠道中重要的益生菌,对维持宿主的微生态平衡和提高免疫功能起着极其重要的作用<sup>[1-3]</sup>。国外大量研究证实<sup>[4-7]</sup>,不同种类的乳酸菌具有降低胆固醇的效果。服用乳酸菌及其相关产品,可降低心血管病的发病率。因此从传统发酵制品中筛选出安全高效的降胆固醇乳酸菌,可为今后益生菌制剂和功能性乳制品开发提供优良菌种。

作者以分离自内蒙古传统发酵乳制品中 14 株乳酸杆菌为研究对象,从中筛选出具有降胆固醇能力较高的乳酸菌,并进行了乳酸菌种的鉴定和灌胃小白鼠的不良影响试验。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

分离自内蒙古传统发酵乳制品中乳酸菌 14 株。TPY 培养基、MRS 培养基、MRS-CHOL 培养基:参照文献[12]进行配制;胆固醇、邻苯二甲醛,巯基乙酸钠、正己烷、冰醋酸:均为分析纯;16S rDNA 基因序列分析材料:参照文献[14]进行配制;清洁级纯系昆明种小鼠:体重(20±2) g,雌雄各半,由内蒙古大学实验动物研究中心提供,许可证号:SCXK(蒙 2002-0001)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 供试菌液的调制** 参照文献[11],对试验菌株进行纯化和革兰氏染色镜检,MRS 液体培养基 37 °C、24 h 活化 2 代,按 1%接种体积分数接种 MRS 三角瓶液体培养(约 120 mL、37 °C、24 h)然后无菌分装于三支离心管中(约 40 mL),按 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液加灭菌生理盐水约 30 mL 洗涤 3 次,按 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,获得菌体细胞,再加 20~30 mL 灭菌生理盐水,分光光度计调供试菌液活菌数约为 3×10<sup>9</sup> CFU/mL。

### 1.2.2 胆固醇的测定

1)标准曲线的绘制:分析天平精确称量分析纯胆固醇 50.00 mg,参照文献[9,14],用无水乙醇定容于 50 mL 的容量瓶中,配成质量浓度为 1.0 g/L 的胆固醇标液。精确吸取 0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL 的胆固醇标准液于 50 mL 容量瓶中,无水乙醇定容,得到 10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 mg/L 的梯度溶液。分别取梯度溶液 1.0 mL 置于 20 mL 试管中,在通风厨中抽干,然后加入 2.0 mL 邻苯二甲醛溶液,磁力搅拌器振荡使其充分溶解,10 min 后加入

1.0 mL 的浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 磁力搅拌器振荡混合均匀,室温条件下放置 10 min 使其显色,波长 550 nm 条件下测其 OD 值,分光光度计用 2.0 mL 邻苯二甲醛溶液加入 1.0 mL 的浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,混合均匀,室温放置 10 min 调零。以胆固醇质量百分比浓度为纵坐标,550 nm 条件下测的 OD 值为横坐标,绘制标准曲线,见图 1。

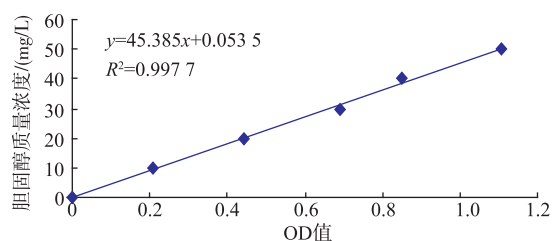


图 1 胆固醇质量浓度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of cholesterol concentration

2)样品处理及测定:参照文献[12],按 1%的接种体积分数将供试菌液在 MRS-CHOL 培养基中 37 °C 厌氧培养 24 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液为待测样品,参照文献[9-10,14],取待测试样品 0.5 mL,加无水乙醇 3.0 mL 和 50%KOH 2.0 mL 振荡器混合均匀,60 °C 水浴恒温 10 min,冷却后加正己烷 5.0 mL,混合均匀,加双蒸水 3.0 mL 后再充分混合,室温静置 15 min 使溶液分层,取正己烷层溶液 2.0 mL 抽干,加入邻苯二甲醛溶液 2.0 mL,室温静置 10 min,加入 1.0 mL 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,混合均匀,放置 10 min 后,550 nm 条件下测 OD 值。根据标准曲线方程计算样品中胆固醇的质量浓度,进而计算胆固醇降解率 *R* 及其单位菌株对胆固醇的去除效力 *E*。

$$R(\text{胆固醇降解率}) = \frac{S_{\text{对照}} - S_{\text{接种}}}{S_{\text{对照}}} \times 100\%$$

$$E(\text{胆固醇去除效力}) = \frac{S_{\text{对照}} - S_{\text{接种}}}{N}$$

式中:*S*<sub>对照</sub>为对照样上清液中胆固醇质量浓度(μg/mL);*S*<sub>接种</sub>为发酵上清液中胆固醇质量浓度(μg/mL);*N*为乳酸菌数的对数值 lg(CFU/g)。

**1.2.3 乳酸菌的生理生化试验** 对筛选到的菌株进行革兰氏染色,在生物显微镜下观察菌体形态,通过氧化氢酶试验、运动性及产酸、产气、糖发酵等生理生化试验进行鉴定<sup>[15]</sup>。

参照文献[11、13、16],采用通用的 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增,得到约 1 500 bp 的特异性扩增

产物,电泳检测扩增产物后,送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序,进而对乳酸菌进行种的鉴定。

### 1.2.4 菌株 N59-1 的致病性试验

1) 试验小鼠分组及给药:将 40 只试验小白鼠随机分为两组,雄雌各半,每组 20 只,其中一组用于空白对照。以约  $3 \times 10^9$  CFU/mL 菌液分别灌胃雌雄小鼠,每次每只小鼠灌胃 1.0 mL,在 24 h 内灌胃 2 次,间隔 8 h,取另一管用灭菌脱脂乳制备成相同浓度的菌悬液,空白对照组小鼠每次每只小鼠灌胃 1.0 mL 脱脂乳培养基,灌胃时间与试验组相同,连续观察 30 d,记录观察期间小鼠表现和死亡情况。

2) 小鼠死亡记录及组织切片的制作:参照文献 [17],对死亡的小鼠进一步做脏器有无病理变化试验和主要器官心、肝、肾、脾、贲门的组织切片观察。若小鼠没有死亡,试验结束时,则从每组中各取一只小鼠,对小白鼠进行摘眼球取血,制备血片,将取血后的小白鼠脱臼致死,进行组织切片观察。

3) 脏器系数的测定<sup>[18]</sup>:取血完毕脱臼处死小鼠,并小心分离出肝、肾,并立即于分析天平上称量质量,计算脏器系数。

$$\text{脏器系数}(\%) = \frac{\text{脏器质量}(g)}{\text{小鼠质量}(g)} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 降胆固醇乳酸菌的筛选

按 1% 的接种体积分数,将供试菌液接种于 MRS-CHOL 培养基中,与对对照样一起在厌氧条件下,37 °C 培养 24 h,分别测定其 pH 值、培养基中胆固醇的质量浓度,并分别计算单位菌株对胆固醇的去除效力  $E$  和胆固醇降解率  $R$ ,结果见图 2~3。图中带有相同字母,表示样品之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ),不同字母表示样品之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

由图 2 可以看出,14 株全部试验菌株对介质中胆固醇都有脱除作用,除 12 和 13 号菌株外,其它 12 株菌株与对对照样相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。试验菌株对胆固醇的脱除力平均值为  $6.63 \mu\text{g}/\text{lg}(\text{CFU}/\text{g})$ ,脱除力高于平均  $6.63 \mu\text{g}/\text{lg}(\text{CFU}/\text{g})$  的菌株有 7 株,代号分别为 2、4、5、6、7、9、11,其中 11 号菌株 N59-1 对胆固醇的脱除力为  $14.85 \mu\text{g}/\text{lg}(\text{CFU}/\text{g})$ ,脱除力最高,代号 15 的菌株对胆固醇的脱除力与平均值相等,脱除力低于平均值  $6.63 \mu\text{g}/\text{lg}(\text{CFU}/\text{g})$  的菌株

有 6 株,代号分别为 3、8、10、12、13、14。菌株间对胆固醇脱除力的差异显著性,如图 2 中字母所示,含有不同字母,表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

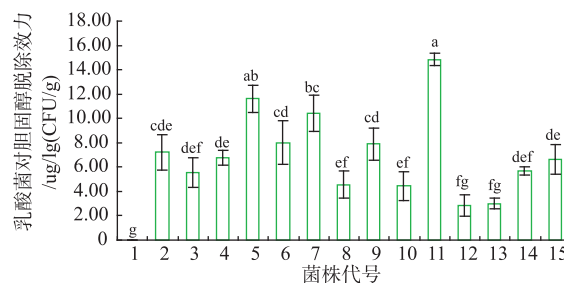


图 2 乳酸菌对胆固醇的脱除效力

Fig. 2 Cholesterol removal effectiveness of lactobacillus from media

由图 3 可以看出,14 株全部试验菌株对介质中胆固醇都有一定的降解作用,除 12 和 13 号菌株外,其它 12 株菌株与对对照样 1 相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。试验菌株对胆固醇的降解率平均值为 15.48%,降解率高于平均值 15.48% 的菌株有 7 株,代号分别为 4、5、6、7、9、11、15,其中 11 号菌株 N59-1 对胆固醇的降解率为 42.97%,降解率最高,降解率低于平均值 15.48% 的菌株有 7 株,代号分别为 2、3、8、10、12、13、14。菌株间对胆固醇降解率的差异显著性,如图 3 中字母所示,含有不同字母,表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

结合图 2 和图 3 可以看出,菌株对胆固醇的脱除力和菌株对胆固醇的降解率有高度的相关性,降解率高的菌株,脱除力也高,代号 11 的菌株 N59-1,对胆固醇的去除率  $R$  高达 42.97%,同时单位菌株对胆固醇的去除效力  $E$  为 14.85,与其它菌株相比差异显著 ( $P < 0.05$ ),故 N59-1 可作为比较理想的筛选菌株。

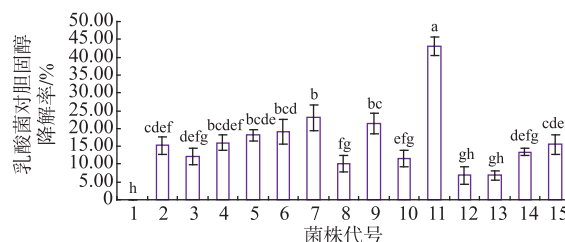


图 3 乳酸菌对胆固醇的降解率

Fig. 3 Cholesterol removal rate of lactobacillus from media

### 2.2 乳酸菌的生理生化鉴定

#### 2.2.1 乳杆菌属的鉴定 采用嗜酸乳杆菌

ATCC4356、保加利亚乳杆菌 JCM1002 和瑞士乳杆菌 ATCC12278 三株标准菌株作为对照菌株进行乳杆菌属的鉴定。经形态学和生理生化试验对筛选的 11 号菌株 N59-1 进行了鉴定,N59-1 发酵葡萄糖但

不产生气体,属同型乳酸发酵,细胞壁中不含有二氨基庚二酸,产生 DL-乳酸,脱脂乳中产酸量为 1.3%,试验结果见表 1。根据表 1 及文献[13],可将试验菌株鉴定为乳酸菌的乳杆菌属。

表 1 乳杆菌的生理生化试验鉴定结果

Table 1 Consequence on identification *Lactobacillus* physiological and biochemical experiment

试验项目	N59-1	JCM1002	ATCC12278	ATCC4356
过氧化氢酶、H <sub>2</sub> S 试验	-	-	-	-
明胶液化、硝酸盐还原试验	-	-	-	-
葡萄糖产气、柠檬酸盐利用	-	-	-	-
运动性、细胞壁 DAP	-	-	-	-
石蕊牛乳液化	-	-	-	-
苹果酸产气	+	-	-	-
石蕊牛乳产酸、脱色、凝固	+	+	+	+
15 ℃ 生长	+	-	-	-
4% NaCl 生长	-	-	+	-
45 ℃ 生长	++	++++	+++	+++
pH 4.5 生长	+++	++++	+++	++
脱脂乳中产酸量/%	1.3	0.835	1.322	0.976
乳酸菌旋光性	DL	D	DL	DL

注:-:阴性,+ :阳性,+w:弱阳性,++、+++、++++:阳性依次增强。

**2.2.2 乳杆菌种的鉴定** 糖发酵试验结果见表 2。由表 2 可以看出,N59-1 均分解木糖、核糖、蔗糖、果糖、淀粉、乳糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、麦芽糖、纤维二糖等产酸,不利用肌醇、菊粉、七叶苷、扁桃苷、松三糖、纤维二糖。根据表 2,参照文献[4]可将 N59-1 归为植物乳杆菌。

表 2 糖发酵试验

Table 2 Capacity of strains to make use of carbon source

糖类	菌株 N59-1	糖类	菌株 N59-1
木糖	+	棉籽糖	+
核糖	+	葡萄糖	+
蔗糖	+	水杨苷	+
果糖	+	甘露醇	+
淀粉	+	山梨醇	+
乳糖	+	肌醇	-
覃糖	+	菊粉	-
甘露糖	+	七叶苷	-
半乳糖	+	扁桃苷	-
麦芽糖	+	松三糖	-
阿拉伯糖	+	纤维二糖	-
葡萄糖酸钠	+		

用 0.8 g/dL 的琼脂糖凝胶对试验菌株 N59-1 的 16S rDNA 扩增产物做电泳检测,经核酸染料染色后,在 1 500 bp 处出现荧光条带,与预期一致,然后用回收的产物直接进行 16S rDNA 序列测定。由菌株 N59-1 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中已知的乳杆菌属内标准菌株的 16S rRNA/rDNA 基因序列同源性百分比对比可知,菌株 N59-1 的 16S rDNA 序列与其它乳杆菌的 16S rRNA/rDNA 序列相似性均大于 84%,是乳杆菌属的菌株。而且菌株 N59-1 与 *L.plantarum* 的标准菌株的同源性为 99.7%,可以认为该菌株是一株 *Lb.plantarum*。

**2.3 菌株 N59-1 的致病性试验**

**2.3.1 菌株 N59-1 对小鼠急性毒性试验结果** 以 3×10<sup>9</sup> CFU/mL 浓度菌液分别灌胃雌雄小鼠,每次每只小鼠灌胃 1.0 mL,在 24 h 内灌胃 2 次,间隔 8 h,观察 7 d,结果发现全部小鼠在整个试验过程中精神状态、毛皮、肤色、饮水、进食量、尿色和粪便与对照组小鼠的情况相同,均未发生任何不良反应和死亡情况,表明试验菌株没有引起小鼠的不良反应。

**2.3.2 菌株 N59-1 对小鼠血液的影响** 试验观察



期30 d时,将每只小白鼠进行摘眼球取血,制备血片。血片结果显示,灌胃试验菌株的小白鼠与对照组的血片相似,细胞分布均匀,形态正常,无异常细胞,白细胞数量正常,没有血小板和红细胞聚集。

**2.3.3 菌株 N59-1 对小鼠重要器官组织形态学的影响** 试验观察期 30 d 时,试验组小鼠肺脏、脾脏、肾脏、心脏与对照组相似。肝脏组织结构正常,肝小叶结构清楚;肺脏结构形态正常,未见明显的病理学改变;脾脏结构形态正常,红髓、白髓清楚可见,

无增生,未见异常改变;肾脏皮质、髓质、肾小球结构正常,肾小管上皮细胞无浊肿或脂肪变性;心脏部位心室、心房、心肌纤维结构清楚,横纹清晰可见,为正常结构,未见炎性细胞侵入,间质未见异常。

**2.3.4 菌株 N59-1 对小鼠脏器系数的影响** 给食含 N59-1 菌液 30 d 称重后,处死小鼠解剖检查心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、肠等全身各脏器,肉眼观察未发现明显异常。取心、肝、肺、肾、脾等靶脏器,用滤纸吸去血液称重,求脏器系数,结果见表 3。

表 3 菌株 N59-1 对小鼠脏器系数的影响 ( $X \pm S, n=10$ )

Table 3 Effect of strain N59-1 on organ coefficient in mice ( $X \pm S, n=10$ )

组别		剂量/(mL/20 g)	动物数	死亡数	心脏系数	肝脏系数	肺脏系数	脾脏系数	肾脏系数	脑系数
对照	雄性	1.0 mL	10	0	0.49±0.06	5.78±0.61	0.68±0.23	0.54±0.31	1.23±0.19	1.37±0.25
	雌性	1.0 mL	10	0	0.51±0.09	6.21±0.036	0.70±0.47	0.51±0.22	1.17±0.40	1.42±0.31
试验	雄性	1.0 mL	10	0	0.51±0.13	6.38±0.88	0.71±0.14	0.48±0.18	1.21±0.22	1.46±0.24
	雌性	1.0 mL	10	0	0.50±0.14	6.19±0.48	0.70±0.21	0.50±0.19	1.19±0.08	1.46±0.37

由表 3 可知,小鼠心脏系数、肝脏系数、肺脏系数、脾脏系数、肾脏系数、脑系数、卵巢或睾丸系数试验组与对照组无显著变化 ( $P>0.05$ ),可见含 N59-1 菌液对小鼠无不良影响。

### 3 结 语

1) 14 株全部试验菌株对 MRS-CHOL 培养基中胆固醇都有一定的脱除作用,脱除率  $R$  在 6.84%~42.97%之间, $R$  的平均值为 16.59%,其中 12 株菌

株与对照样相比差异显著 ( $P<0.05$ ),菌株 N59-1 对胆固醇的脱除率最高,数值为 42.97% ( $P<0.05$ )。

2) 菌株 N59-1 与标准菌株 *L.plantarum* 的同源性约为 99.7%,菌株 N59-1 可判定为 *L.plantarum*。

3) 在 30 d 的灌胃期内,菌株 N59-1 在行为、血液和重要器官组织形态学、脏器系数方面,试验组与对照组无显著差异 ( $P>0.05$ ),可见含 N59-1 菌液对小鼠无不良影响。

### 参考文献:

[1] ZHANG Fang, HANG Xiaomin, FAN Xiaobing, et al. Selection and optimization procedure of synbiotic for cholesterol removal[J]. *Anaerobe*, 2007, 13: 185-192.

[2] Papamanoli, Tzanetakis E, Litopoulou-Tzanetaki N, et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties[J]. *Meat Science*, 2003, 65(2): 859-867.

[3] ZHAO Liping, SHEN Jian. Whole-body systems approaches for gut microbiota-targeted, preventive health care [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 149(3): 183-190.

[4] Lin S Y, Ayres J W, Winkler W, et al. *Lactobacillus* effects on cholesterol: in vitro and in vivo results [J]. *Journal of Dairy Science*, 1989, 72(11): 2885-2889.

[5] KEYS, ANCEL. Serum cholesterol response to dietary cholesterol [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1986, 44(2): 309.

[6] Liang M T, Shan N P. Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora and organic acids in rats[J]. *Journal Dairy of Science*, 2006, 89(5): 1390-1399.

[7] JUNGAE J, KIM S, CHO S Y, et al. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCT3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice[J]. *Nutrition*, 2009, 26(3): 321-330.

[8] WANG Y, XU N, XI A, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from tibet kefir on lipid metabolism and intestinal

- microflora of rats fed on high-cholesterol diet[J]. **Applied Microbiology Biotechnology**, 2009, 84(2):341-347.
- [9] GILLAND S E, NELSON C R, MAXWELL C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1985, 49:377-381.
- [10] Rude L L, Morris D M. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde[J]. **J Lipid Res**, 1973, 14:364-366.
- [11] Kuwahara T, L Norimatsa. Genetic variation in 16S-23S rDNA interal transcribed spacer region and the possible use of this genetic variation for molecular diagnosis of *Bacteriodes* species[J]. **Microbiol Immunol**, 2001, 45:191-199.
- [12] 田建军. 高效降胆固醇乳酸菌的筛选及其在发酵乳中的应用[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2006.
- [13] 康白. 微生物实验手册[M]. 大连:大连出版社, 1988.
- [14] 田建军, 张开屏, 靳焯. 高效降胆固醇乳酸菌的筛选[J]. **食品科技**, 2011, 11:21-25.
- TIAN Jianjun, ZHANG Kaiping, JIN Ye. Screening of *Lactobacillus* for efficient cholesterol-degrading [J]. **Food Science and Technology**, 2011, 11:21-25. (in Chinese)
- [15] 布坎南 R E, 吉布斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册(第8版)[M]. 中国科学院微生物研究所译. 北京:科学出版社, 1984.
- [16] 王俊国. 降胆固醇益生乳杆菌的筛选及其降胆固醇作用的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2008.
- [17] 田欣田, 董文德, 邱震东. 现代动物病理学实验技术[M]. 北京:中国农业大学出版社, 1992.
- [18] GB15193.1-2003. 国家标准食品安全学毒理学评价程序[S]. 北京:中国标准出版社, 2003.

## 科技信息

### 欧盟修订抗坏血酸钙和海藻酸钠的使用规定

2014年9月12日, 欧盟发布(EU) No 969/2014号法规, 修订关于食品添加剂(EC) No 1333/2008号法规的附件II中关于抗坏血酸钙(E 302)和海藻酸钠(E 401)在一些未加工的水果和蔬菜中的使用规定。修订如下:

E 编号	名称	限量标准(mg/L 或 mg/kg)	脚注	限制/例外
E 401	海藻酸钠	2 400	(82)	仅限预包装冷藏未加工水果和蔬菜, 销售给最终消费者。
(82)只能与 E 302 联合作为上光剂使用, 终产品中最高含量为 E 302:800mg/kg。				

[信息来源] 国家质量监督检验检疫总局. 欧盟修订抗坏血酸钙和海藻酸钠的使用规定 [EB/OL]. (2014-9-23). [http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk\\_13386/tzdt/gzdt/201409/](http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk_13386/tzdt/gzdt/201409/)

### 欧盟将褐煤酸酯移出许可食品添加剂清单

据欧盟网站消息, 9月11日欧盟发布(EU)No957/2014法规, 将褐煤酸酯移出许可的食品添加剂清单。

目前欧盟(EC) No 1333/2008 批准褐煤酸酯作为上光剂, 用于处理柑橘、西瓜、芒果、鳄梨、菠萝的表面。欧委会认为, 尚未获得有关褐煤酸酯毒代动力学及发育毒性的数据, 而且褐煤酸酯的短期及亚慢性毒性、基因毒性、慢性毒性及致癌性有效数据是有限的, 并且尚未提交任何使用数据。鉴于无最新科学数据证明有必要将褐煤酸酯纳入食品添加剂名单, 因此应修改第(EC)1333/2008号法规附件II与231/2012号法规, 将其从食品添加剂批准清单移出。

本法规自发布公告后第20天起生效。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟将褐煤酸酯移出许可食品添加剂清单 [EB/OL]. (2014-9-18). <http://news.foodmate.net/2014/09/275924.html>