



中华人民共和国国家标准

GB 1886.231—2016

食品安全国家标准

食品添加剂 乳酸链球菌素

2016-08-31 发布

2017-01-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

食品安全国家标准

食品添加剂 乳酸链球菌素

1 范围

本标准适用于经乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* subsp *lactis*)发酵后提取而制得的食物添加剂乳酸链球菌素。

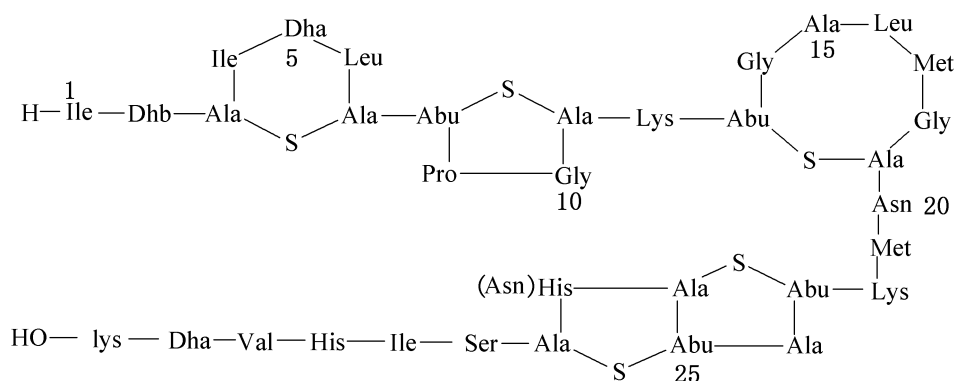
2 分子式、结构式和相对分子质量

2.1 分子式

$C_{143}H_{230}O_{37}N_{42}S_7$ (Nisin A)

$C_{141}H_{228}O_{38}N_{41}S_7$ (Nisin Z)

2.2 结构式



Nisin A:第 27 位氨基酸为组氨酸(His);Nisin Z:第 27 位氨基酸为天冬酰胺(Asn)

2.3 相对分子质量

Nisin A:3354.35(按 2013 年国际相对原子质量)

Nisin Z:3330.31(按 2013 年国际相对原子质量)

3 技术要求

3.1 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	浅棕色至乳白色	将适量试样均匀置于白瓷盘内,在自然光线下观察其色泽和状态
状态	粉末	

3.2 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
效价/(IU/mg)	\geq 900	附录 A 中的 A.3
干燥减量, $w/\%$	\leq 3.0	GB 5009.3
氯化钠, $w/\%$	\geq 50.0	GB/T 5009.42
铅(Pb)/(mg/kg)	\leq 1.0	GB 5009.75
注:商品化的乳酸链球菌素产品应以符合本标准的乳酸链球菌素为原料,可添加氯化钠、乳固体等辅料而制成,其效价符合声称。		

3.3 微生物指标

微生物指标应符合表 3 的规定。

表 3 微生物指标

项 目	指 标	检验方法
菌落总数/(CFU/g)	\leq 10	GB 4789.2
大肠菌群/(MPN/g)	$<$ 3.0	GB 4789.3
大肠埃希氏菌/(MPN/g)	$<$ 3.0	GB 4789.38
沙门氏菌	不得检出	GB 4789.4

附录 A 检验方法

A.1 一般规定

本标准除另有规定外,所用试剂的纯度应为分析纯,所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品,应按 GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603 的规定制备,试验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规定。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时,均指水溶液。

A.2 鉴别试验

A.2.1 试剂和材料

- A.2.1.1 盐酸溶液:0.02 mol/L。
- A.2.1.2 氢氧化钠溶液:5 mol/L。
- A.2.1.3 脱脂牛奶:脂肪含量 $<1\%$ 。
- A.2.1.4 石蕊牛奶培养基。
- A.2.1.5 检测菌:乳酸乳球菌(ATCC11454, NCIMB 8586)。

A.2.2 分析步骤

A.2.2.1 试样储备液制备

取 1 g 试样,溶于 1 L 盐酸溶液中,溶液效价约为 1 000 IU/mL。

A.2.2.2 对酸溶液的稳定性试验

用盐酸溶液将试样储备液稀释至约 50 IU/mL,制成试样溶液。将该试样溶液煮沸 5 min,按效价测定方法测煮沸过的试样溶液中 Nisin 效价。计算煮沸过的试样中 Nisin 的效价,计算结果在其效价值的 $(100\% \pm 5\%)$ 内,表明无显著活性损失。

A.2.2.3 对碱溶液的稳定性试验

用盐酸溶液将试样储备液稀释至约 50 IU/mL,制成试样溶液。将该试样溶液煮沸 5 min,用氢氧化钠溶液调 pH 至 11.0 将溶液加热到 65 °C 保持 30 min,冷却。然后滴加盐酸调 pH 至 2.0,用效价测定方法测定最终溶液中 Nisin 的效价。在按照上述操作处理后会呈现抑菌活性的几乎完全损失。

A.2.2.4 不同抑菌物质中 Nisin 的鉴别

A.2.2.4.1 乳酸乳球菌的培养:乳酸乳球菌(工作菌株)(ATCC11454, NCIMB 8586)在无菌脱脂牛奶中培养,30 °C 培养 18 h。

A.2.2.4.2 准备 1 个或多个装有 100 mL 石蕊牛奶培养基的长颈烧瓶,在 121 °C 灭菌 15 min,将 0.1 g 试样加入该无菌的石蕊牛奶培养基中混匀,在室温下静置 2 h 后加入 0.1 mL 检测菌,30 °C 下培养 24 h。

A.2.2.4.3 检测菌(乳酸乳球菌)可在该效价的试样(约 1 000 IU/mL)中生长,但不能在相似浓度的其他抑菌物质中生长。

A.3 效价的测定

A.3.1 试剂和材料

A.3.1.1 乳酸链球菌素标准品(效价: 1×10^6 IU/g)。

A.3.1.2 盐酸溶液: 0.02 mol/L。

A.3.1.3 吐温溶液: 吐温 20 : 水 = 1 : 1。

A.3.1.4 培养基(S_1): 胰蛋白胨 0.8%; 酵母膏 0.5%; 葡萄糖 0.5%; 氯化钠 0.5%; 磷酸氢二钠 0.2%; 琼脂粉 1.2%~1.5%, 灭菌后 pH 6.8~7.0。

A.3.1.5 检测菌: 黄色微球菌(NCIB8166)。

A.3.2 分析步骤

A.3.2.1 检测菌(NCIB8166)的培养及菌悬液的制备

A.3.2.1.1 检测菌的培养

用无菌接种环从甘油管或冻干管中取一环检测菌(NCIB8166), 接种在无菌的 S_1 平皿上, 进行自然分离, 挑出饱满、边缘光滑的菌落, 扩大, 接在 S_1 的试管斜面上, 在 30 °C 恒温箱中培养 24 h, 放入 2 °C~5 °C 冰箱中。

A.3.2.1.2 菌株悬浮液的制备

取在冰箱中的检测菌(NCIB8166), 用无菌生理盐水洗脱下来, 制成 10^8 CFU/mL 浓度的细胞悬液, 备用。

A.3.2.2 平板的制备

配制 S_1 培养基 200 mL(按比例先把琼脂溶化, 依次加入各组分溶解, 磷酸氢二钠溶解后加入), 经 121 °C、20 min 灭菌后, 放冷至 70 °C 左右, 加入 4 mL 吐温 20 溶液, 充分摇匀, 等冷却到 50 °C~55 °C 左右, 加入已制备好的菌株悬浮液适量, 使培养基中检测菌的最终浓度为 1.0×10^6 个/mL, 摇匀, 倒入水平放置的已灭菌的平板中, 等完全凝固后, 用直径为 7 mm 打孔器, 在平板上打出所需的孔数, 小心挖掉孔内琼脂, 移入洁净工作台中吹风 1.5 h~3.0 h(吹风时间按空气中的湿度大小而定, 同时控制室内温度最低, 尽量不要让检测菌生长), 吹干后, 置 2 °C~5 °C 冰箱中, 到次日使用。

A.3.2.3 标准品溶液的制备

准确称取乳酸链球菌素标准品(精确到 0.000 1 g), 溶于盐酸溶液中, 使最终浓度为 2 mg/mL (2 000 IU/mL), 摇匀, 用盐酸稀释成 300 倍、600 倍, 即成高、低剂量标准溶液。

A.3.2.4 试样溶液的制备

称取一定量的试样(精确到 0.000 1 g), 用盐酸溶液溶解后, 稀释成高、低剂量试样溶液, 其乳酸链球菌素含量, 按估计单位高、低剂量与标准品溶液大致相当。

A.3.2.5 滴加溶液

取出存放在冰箱中的平板, 用移液器, 取 70 μ L~80 μ L 标准品高剂量溶液, 随机滴加在平板的孔中, 滴 6 个孔, 再取 70 μ L~80 μ L 标准品低剂量溶液, 随机滴加在与高剂量溶液同一平板其余孔的 6 个

孔中。

试样溶液和标准品溶液滴在同一平板上,其操作同标准品。

A.3.2.6 恒温培养

等孔内的溶液渗透完全后,移入 30 °C 恒温箱中培养 16 h~24 h 后,测量抑菌圈直径。

A.3.3 结果计算

用卡尺测量抑菌圈直径,取其平均值,按式(A.1)计算效价:

$$C_{SH} = C_{BH} \times k \frac{(X_{SH} + X_{SL}) - (X_{BH} + X_{BL})}{(X_{SH} + X_{BH}) - (X_{SL} + X_{BL})} \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

C_{SH} —— 试样溶液的效价,单位为国际单位每毫克(IU/mg);

C_{BH} —— 标准溶液的效价,单位为国际单位每毫克(IU/mg);

X_{SH} —— 高剂量试样溶液所致的抑菌圈直径,单位为毫米(mm);

X_{SL} —— 低剂量试样溶液所致的抑菌圈直径,单位为毫米(mm);

X_{BH} —— 高剂量标准溶液所致的抑菌圈直径,单位为毫米(mm);

X_{BL} —— 低剂量标准溶液所致的抑菌圈直径,单位为毫米(mm);

k —— 高剂量与低剂量浓度的比值。

若试样估计值不在测定值的 90%~110% 范围内,需重新估计试样效价,重测。