



中华人民共和国国家标准

GB 1886.231—2023

食品安全国家标准 食品添加剂 乳酸链球菌素

2023-09-06 发布

2024-03-06 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB 1886.231—2016《食品安全国家标准 食品添加剂 乳酸链球菌素》。

本标准与 GB 1886.231—2016 相比,主要变化如下:

- 修改了氯化钠的检测方法,将“GB/T 5009.42”修改为“GB 5009.44—2016 中‘银量法’”;
- 修改了效价的检测方法。

食品安全国家标准
食品添加剂 乳酸链球菌素

1 范围

本标准适用于以脱脂乳固体,或以酵母抽提物等其他含氮物质,以及含碳物质为主要原料,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(Nisin)。

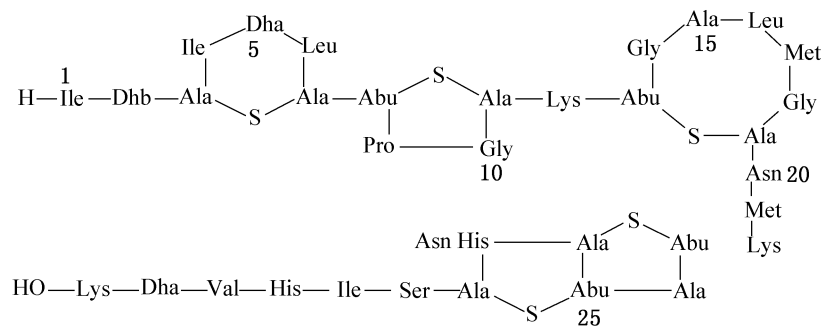
2 分子式、结构式和相对分子质量

2.1 分子式

C₁₄₃H₂₃₀O₃₇N₄₂S₇ (Nisin A)

C₁₄₁H₂₂₉O₃₈N₄₁S₇ (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 2018 年国际相对原子质量)

Nisin Z: 3330.31 (按 2018 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,于自然光线下观察其色泽和状态
状态	粉末	
气味	无异味	

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)		

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)	≤	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/ 25 g		GB 4789.4

附录 A

检验方法

A.1 一般规定

本标准所用试剂和水在没有任何注明其他要求时,均指分析纯试剂和 GB/T 6682 规定的三级水。试验中所用标准溶液、制剂和制品,在没有任何注明其他要求时均按 GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603 的规定制备。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 $\leq 1\%$ 。

A.2.1.4 石蕊牛奶培养基。

A.2.1.5 检测菌:乳酸乳球菌(ATCC11454,NCIMB8586)。

A.2.2 分析步骤

A.2.2.1 试样储备液制备

称取适量试样溶于盐酸溶液中,使其溶液效价约为 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,按效价测定方法测定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 出现抑菌活性几乎完全损失的情况。

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,NCIMB8586)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 1000 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

A.3.1 试剂和材料

A.3.1.1 乳酸链球菌素标准品(效价 $\geq 1 \times 10^6$ 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(S₁):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,NCIMB8166。

A.3.1.6 0.85%无菌生理盐水。

A.3.2 仪器和设备

A.3.2.1 打孔器。

A.3.2.2 培养箱,精度 30 °C \pm 1 °C。

A.3.2.3 移液器。

A.3.2.4 温度计,精度 50 °C \sim (55 \pm 1)°C。

A.3.2.5 灭菌锅。

A.3.2.6 电子分析天平,精确到 0.000 01 g。

A.3.3 分析步骤

A.3.3.1 检测菌(NCIMB8166)的培养及菌悬液的制备

A.3.3.1.1 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(NCIMB8166),接种在无菌的 S₁ 平皿上,进行自然分离,挑出饱满、边缘光滑的菌落,扩大,接在 S₁ 的试管斜面上,在 30 °C 恒温箱中培养 24 h,放入 2 °C \sim 5 °C 冰箱中。

A.3.3.1.2 菌株悬浮液的制备

取在冰箱中的检测菌(NCIMB8166),用无菌生理盐水洗脱下来,制成 10⁸ CFU/mL 浓度的细胞悬液,备用。

A.3.3.2 平板的制备

配制 S₁ 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,放冷至不低于 70 °C,加入 4 mL 吐温 20 溶液,充分摇匀,待冷却到 50 °C \sim 55 °C,加入适量已制备好的菌株悬浮液,使培养基中检测菌的最终浓度为 1.0 \times 10⁶ CFU/mL,摇匀,倒入水平放置的已灭菌的平板中,待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,置 2 °C \sim 5 °C 冰箱中,准备使用前,移入洁净工作台中吹风 1.5 h \sim 3.0 h 后使用(吹风时间按 S₁ 培养基的硬度和环境湿度等调整,不宜过份干燥导致培养基开裂,同时控制室内温度最低,尽量不要让检测菌生长)。

A.3.3.3 标准品溶液的配制

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 2 000 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.3.3.4 试样溶液的配制

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,按试样估价(C_{BH})高、低剂量与标准品溶液高、低剂量大致相当。

A.3.3.5 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,随机滴加到平板的孔中,滴 6 个孔,再取 70 μ L~80 μ L 标准品低剂量溶液,随机滴加到与高剂量溶液同一平板其余 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.3.3.6 恒温培养

等孔内的溶液渗透完全后,移入 30 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 16 h~24 h 后,测量抑菌圈直径,最佳抑菌圈直径范围为 18 mm~24 mm。

A.3.4 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。

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

式中:

C_{SH} ——试样的效价,单位为国际单位每毫克(IU/mg);

C_{BH} ——试样的估价,单位为国际单位每毫克(IU/mg);

K ——高剂量与低剂量浓度的比值;

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)。

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。