



中华人民共和国国家标准

GB xxxx—xxxx

食品安全国家标准
食品添加剂 乳酸链球菌素

(征求意见稿)

202x-xx-xx发布

202x-xx-xx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

本标准替代GB 1886.231-2016《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，原来的GB/T 5009.42修改为GB 5009.44-2016第三法；
- 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

本标准适用于以酵母抽提物或其他含氮物质为主要原料，经乳酸乳球菌（*Lactococcus lactis subsp lactis*）发酵后提取而制得食品添加剂乳酸链球菌素。

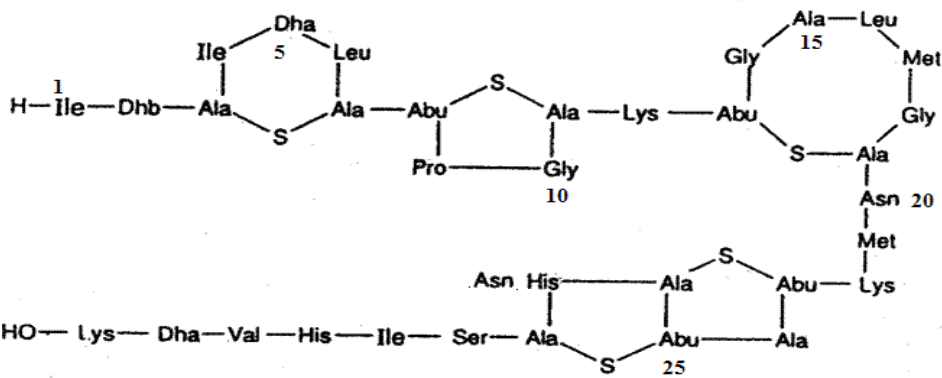
2 分子式、结构式和相对分子质量

2.1 分子式

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	粉末	

气味	无异味	状态
----	-----	----

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) ≥	900	附录 A 中的 A.3
干燥减量, w/% ≤	3.0	GB 5009.3
氯化钠, w/% ≥	50.0	GB/T 5009.44-2016 第三法
铅 (Pb) /(mg/kg) ≤	1.0	GB 5009.75 或 GB5009.12
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	采样方案 ^a 及限量			检验方法
	n	c	m	
菌落总数/(CFU/g)	5	2	10	GB4789.2
大肠菌群/(MPN/g)	5	0	<3.0	GB4789.3
大肠埃希氏菌/(MPN/g)	5	0	<3.0	GB4789.38
沙门氏菌	5	0	不得检出/25g	GB4789.4
^a 样品的采样按 GB 4789.1 执行				

附录 A

检验方法

A.1 一般规定

本标准除另有规定外，所用试剂的纯度应在分析纯以上，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，实验用水应符合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

称取适量试样溶于盐酸溶液中，使其溶液效价约为 1000 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%±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℃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抑制活性的几乎完全损失。

A.2.2.4 不同抑菌物质中 Nisin 的鉴别

通过乳酸链球菌对高浓度 Nisin 的耐受性将 Nisin 和其他抑菌物质区分。

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℃培养 18h。

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℃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℃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 1000IU/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。

A.3.2.3 移液器。

A.3.2.4 温度计。

A.3.2.5 灭菌锅。

A.3.2.6 电子分析天平。

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℃恒温箱中培养24 h，放入2℃~5℃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℃、20 min灭菌后，放冷至不低于70℃，加入4 mL吐温20溶液，充分摇匀，等冷却到50℃~55℃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1.0×10⁶ 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，置2℃~5℃冰箱中，准备使用前，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)，吹干后使用。

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0.0001g)，溶于盐酸溶液中，使最终浓度为2000 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0.0001g)，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 μL~80 μL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 μL~80 μL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.3.3.6 恒温培养

等孔内的溶液渗透完全后，移入30℃恒温箱中培养16 h~24 h后，使得直径范围在18mm~24 mm之间，测量抑菌圈直径。

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）；

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。
