



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—××××

饲料添加剂 第5部分：微生物 植物乳杆菌

Feed additive —Part 5: Live microorganisms — *Lactobacillus plantarum*

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家市场监督管理总局

国家标准化管理委员会 发布

前 言

GB 7300《饲料添加剂》按产品分为若干部分：

本部分为 GB 7300 的第 503 部分。

本部分按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由中华人民共和国农业农村部提出并归口。

本部分起草单位：国家粮食局科学研究院。

本标准主要起草人：张晓琳、韩伟、李爱科、魏永刚、李晓敏、赵晨、黄颖、郝淑红。

饲料添加剂 植物乳杆菌

1 范围

GB 7300 的本部分规定了饲料添加剂植物乳杆菌的术语和定义、产品要求、试验方法、检测规则、标签、包装、运输、储存、保质期的要求。

本标准适用于仅含植物乳杆菌的饲料添加剂。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 4789.2	食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
GB/T 4789.3	食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群测定
GB/T 4789.5	食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验
GB/T 4789.10	食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验
GB/T 4789.15	食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
GB/T 6435	饲料中水分的测定
GB/T 8170	数值修约规则与极限数值的表示和判定
GB/T 10648	饲料标签
GB/T 13079	饲料中总砷的测定
GB/T 13080	饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
GB/T 13081	饲料中汞的测定
GB/T 13082	饲料中镉的测定方法
GB/T 13091	饲料中沙门氏菌的测定
GB/T 14699.1	饲料 采样
GB/T 17480	饲料中黄曲霉毒素 B1 的测定 酶联免疫吸附法

3 术语和定义

植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*

属于乳杆菌科、乳杆菌属，革兰氏阳性，菌体杆状，无芽孢，模式菌株为 ATCC 14917。

4 要求

4.1 微生物学指标

4.1.1 菌体形态

菌体细胞呈圆端直杆状，通常 $0.9\mu\text{m}\sim 1.2\mu\text{m}$ 宽， $3\mu\text{m}\sim 8\mu\text{m}$ 长，单个、成对或成短链。

4.1.2 菌落形态

植物乳杆菌在改良 TJA、改良 MC 或 MRS 培养基上菌落生长形态特征如表 1。

表 1 植物乳杆菌在不同培养基上菌落特征

改良 TJA	改良 MC	MRS
平皿底为黄色，菌落中等大小，微白色，湿润，边缘不整齐，直径 $3\text{ mm}\pm 1\text{ mm}$ ，如棉絮团状菌落	平皿底为粉红色，菌落较小，圆形，红色，边缘似星状，直径 $2\text{ mm}\pm 1\text{ mm}$ ，有淡淡的晕	菌落为白色，较大，直径 $3\text{ mm}\pm 1\text{ mm}$

4.1.3 生理生化特征

在改良 TJA、改良 MC 或 MRS 琼脂斜面上，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，24h~48h 培养，刮取菌苔，进行表 2 中试验，以验证植物乳杆菌生理生化特征。

表 2 植物乳杆菌生理生化特征

特征	结果	特征	结果
革兰氏染色	+	蔗糖	+
4% 牛磺胆酸钠	+	麦芽糖	+
精氨酸产氨	-	甘露醇	+
碳水化合物反应		水杨苷	+
七叶苷	+	山梨醇	+
纤维二糖	+	棉籽糖	+
注：+为阳性反应；-为阴性反应。			

4.2 感官指标

产品性状应符合包装上标明的产品固有的形状、色泽、气味、均匀程度、杂质等，无异臭味。

4.3 水分

不高于 8.0%。

4.4 活菌数

植物乳杆菌活菌数 $\geq 1.0 \times 10^9$ CFU/g。

注：活菌数以菌落形成单位（colony-forming units, CFU）表示。

4.5 卫生标准

植物乳杆菌饲料添加剂应符合表 3 的要求。

表 3 植物乳杆菌饲料添加剂卫生指标

项目	指标
杂菌率, %	≤ 1.0
黄曲霉毒素 B1, $\mu\text{g}/\text{kg}$	≤ 10.0
砷的允许量, mg/kg	≤ 2.0
铅的允许量, mg/kg	≤ 5.0
汞的允许量, mg/kg	≤ 0.1
镉的允许量, mg/kg	≤ 0.5
大肠菌群的允许量, CFU/100 g	≤ 400
霉菌和酵母总数的允许量, CFU/g	$< 1.0 \times 10^4$
致病菌（志贺氏菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌）	不得检出

5 试验方法

5.1 抽样

按 GB/T 14699.1 进行样品的采集。采样时应特别注意样品的代表性和避免采样时的污染。首先准备好灭菌容器和采样工具，如灭菌牛皮纸袋、均质袋或广口瓶、金属勺和刀。在卫生学调查基础上，采取有代表性的样品，样品采集后应立即进行检验。

5.2 感官检验

取一定量（250 g）的样品于无色玻璃杯中，自然光线下采用目测、鼻嗅的方法进行检验。

5.3 水分测定

按 GB/T 6435 检测。

5.4 植物乳杆菌检测

5.4.1 检验程序

植物乳杆菌检验程序流程图如图 1。

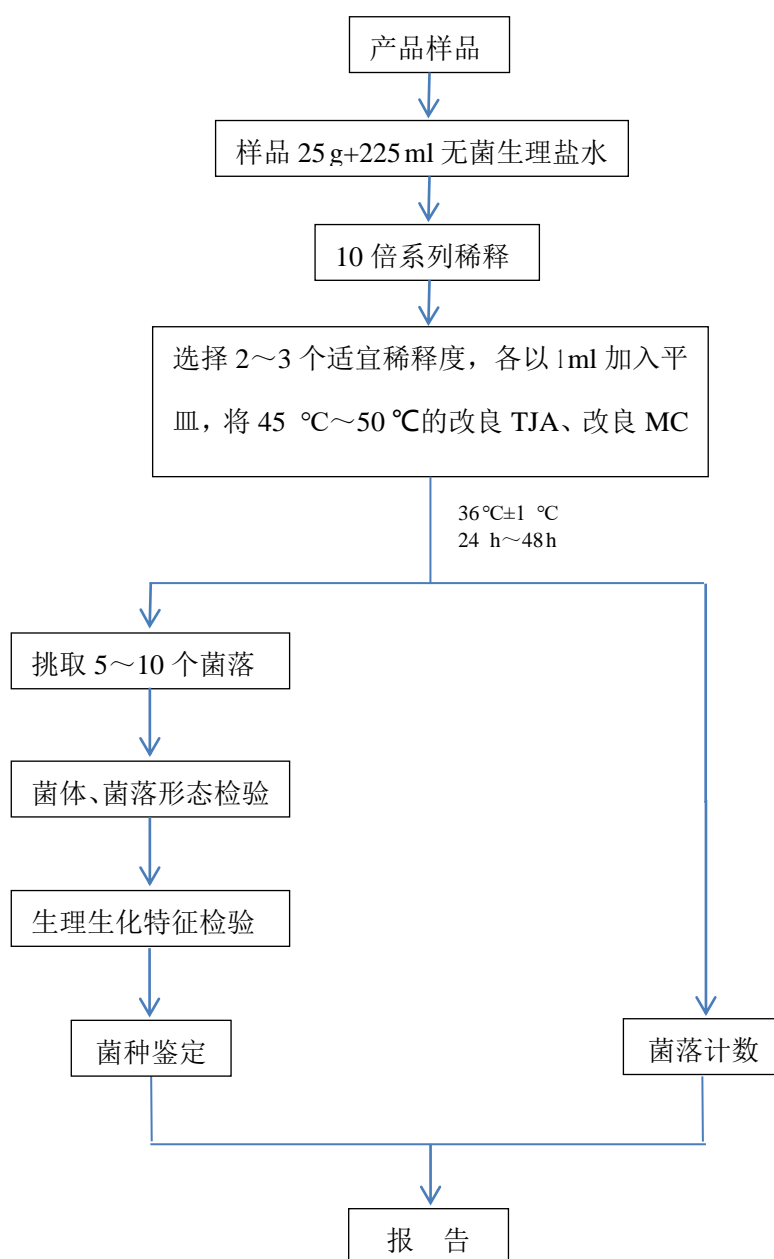


图 1 植物乳杆菌检验程序流程图

5.4.2 菌种鉴定

5.4.2.1 样品制备

在按照 GB/T 14699.1 进行采样基础上，称取 $25.0\text{g}\pm 0.01\text{g}$ 样品，加入 225 ml 无菌生理盐水中均质，待均匀后，再将样品用无菌生理盐水按十倍稀释法制成不同浓度稀释液。取 1.0ml 合适浓度稀释液，注入无菌平板，每个稀释度做 3 次重复。将融化并冷却至 $45\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的改良 TJA、改良 MC 或 MRS 培

培养基，向每个培养皿中倒入约 15 ml~20 ml，摇匀并凝固，制成相应培养基的琼脂平板。36℃±1℃倒置培养 24h~48h。

5.4.2.2 菌落选择：用接种针或接种环随机挑取 5~10 个菌落。

5.4.2.3 菌体形态检验：涂片染色，用光学显微镜观察菌体形态。

5.4.2.4 菌落形态检验：观察菌落颜色、形态。

5.4.2.5 生理生化特征检验：接种并进行 4.1.3 表 2 中各项试验。

5.4.3 菌落计数

5.4.3.1 植物乳杆菌计数

5.4.2.1 项中菌落总数减去杂菌数之差，即得植物乳杆菌计数结果。

5.4.3.2 稀释度

选取适宜的稀释度，菌落在 30~300 之间的平板进行计数。

5.4.3.3 计算方法

计算方法见公式 (1)。

$$N = \sum C / [V(n_1 + 0.1n_2)d] \dots\dots\dots (1)$$

式中：N——样品中菌落总数

$\sum C$ ——两个连续稀释度全部平板上菌落数总和

V——每个平板上接种的体积，ml

n_1 ——第 1 个稀释度（低稀释倍数）平板个数

n_2 ——第 2 个稀释度（高稀释倍数）平板个数

d——相对第 1 稀释度的稀释因数

结果为每克产品微生物菌落数，以科学计数法表示结果。

具体结果输出实例应参考 GB/T 4789.2-2010。

5.4.3.4 允许差

两次平行测定结果的相对偏差不大于 2%。

5.5 卫生检验

5.5.1 杂菌率检测

$$\text{杂菌率} = \text{杂菌数} / (\text{植物乳杆菌活菌数} + \text{杂菌数}) \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

5.5.2 黄曲霉素 B1 检验

按照 GB/T 17480 执行。

5.5.3 砷含量测定

按照 GB/T 13079 执行。

5.5.4 汞含量测定

按照 GB/T 13081 执行。

5.5.5 镉含量测定

按照 GB/T 13082 执行。

5.5.6 铅含量测定

按照 GB/T 13080 执行。

5.5.7 霉菌和酵母总数检测

按照 GB/T 4789.15 执行。

5.5.8 大肠菌群检测

按照 GB/T 4789.3 执行。

5.5.9 致病菌检测

按照 GB/T 4789.5、GB/T 4789.10、GB/T 13091 执行。

6 检验规则

6.1 出厂检验（交收检验）

感官指标、水分、微生物含量（包括活菌数和杂菌）为出厂检验项目，由生产厂家或公司的质检部门进行检验，检验合格并签发质量合格证的产品方可出厂。

6.2 型式检验（例行检验）

6.2.1 一般情况下，企业一年进行一次型式检验，下列检验项应包括：

- a) 菌种遗传特征检验；与《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》（《伯杰氏系统细菌学手册》）所列模式菌株 ATCC 14917 的 16S rRNA (16S 核糖体核糖核酸)基因全序列进行比对，相似度在 99% 以上。
- b) 国家质量监督机构要求的其它型式检验。

6.2.2 但有下列情况之一时，企业半年进行一次型式检验，下列检验项应包括：

- a) 更改主要原辅材料和关键生产工序；
- b) 新试制的产品或正常生产的产品停产 3 个月以上（或半年），重新恢复生产时；
- c) 国家质量监督机构提出要求进行型式检验。

7 判定规则

7.1 所验项目全部合格，判定为该批次产品合格。

7.2 检验结果中有任何指标不符合本部分规定时，可自同批产品中重新加倍取样进行复检。复检结果即使有一项指标不符合本部分规定，则判定该批产品不合格。

7.3 各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 中全数值比较法执行。

8 标签、包装、运输、储存、保质期

8.1 标签

8.1.1 采用鲜明的标签贴于外包装显著位置；

8.1.2 标签内容应符合 GB 10648 的要求；

8.1.3 标签应标明所添加微生物的学名和数量。

8.2 包装

应采用符合国家相关标准的、无毒的包装材料。

8.3 运输

运输中应避免日晒，搬运装卸时小心轻放，不得与有毒物质混装混运。

8.4 储存

应保存于干燥、阴凉、通风的仓库中，避免直接日晒和高温地表放置，防止长时间 30℃以上高温，不得和有毒、有害物质一起堆放，严防污染。建议使用 10℃以下的冷藏条件。

8.5 保质期

本产品保质期为 6 个月。

附录 A
(资料性附录)
专用培养基及试剂

A.1 改良番茄琼脂培养基 (改良 TJA 培养基)

A.1.1 成分

番茄汁	50.0 ml
酵母抽提液	5.0 g
牛肉膏	10.0 g
乳糖	20.0 g
葡萄糖	2.0 g
磷酸氢二钾	2.0 g
吐温-80	1.0 g
乙酸钠	0.5 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	加至 1 000 ml

pH 6.8±0.2

A.1.2 制法

番茄汁的制作：将新鲜番茄洗净，切碎（切勿捣碎），放入锥形瓶，置 4℃冰箱 8h~12h，取出后用纱布过滤。如一次使用不完，可将其置入 0℃冰箱，可保存四个月。使用时让其常温下自然溶解。

制法：将所有成分加入蒸馏水中，加热溶解，校正 pH6.8±0.2。分装，121℃高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热融化琼脂，冷至 45℃~50℃时使用。

A.2 改良 MC 培养基

A.2.1 成分

大豆蛋白胨	5.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
葡萄糖	20.0 g
乳糖	20.0 g

碳酸钙	10.0 g
琼脂	18.0 g
1%中性红溶液	5 ml
硫酸多粘菌素 B（酌情而加）	10 万 IU
蒸馏水	加至 1000 ml

pH6.0

A.2.2 制法

将前面 7 种成分加入蒸馏水中，加热溶解，校正 pH 6.0，加入中性红溶液。分装烧瓶，121℃高压灭菌 15 min~20 min。临用时加热融化琼脂，冷至 45℃~50℃时使用，酌情加或不加硫酸多粘菌素 B（疑有杂菌污染时，可加多粘菌素 B，混匀后使用）。

A.3 MRS 培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	10.0 g
酵母浸膏	5.0 g
葡萄糖	20.0 g
吐温-80	1.0 g
柠檬酸铵	2.0 g
乙酸钠	5.0 g
硫酸镁	0.1 g
硫酸锰	0.05 g
磷酸氢二钾	2.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	加至 1000 ml

pH 7.3±0.2

A.3.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，加热不断搅拌，煮沸使琼脂完全溶解，115℃高压灭菌 25 min~30 min。

A.4 营养琼脂培养基

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	加至 1000 ml

pH 7.0±0.2

A.4.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，加热不断搅拌，煮沸使琼脂完全溶解，121℃高压灭菌 25 min~30 min。

A.5 生理盐水

A.5.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	加至 1000 ml

A.5.2 制法

将氯化钠加入蒸馏水中，搅拌溶解，分装，121℃高压灭菌 15 min。

A.6 革兰氏染色液

A.6.1 结晶紫染色液

A.6.1.1 成分

结晶紫	8.5 g
95%乙醇	20 ml
1%草酸铵水溶液	80 ml

A.6.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.6.2 革兰氏碘液

A.6.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 ml

A.6.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 ml。

A.6.3 沙黄复染液

A.6.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 ml
蒸馏水	90 ml

A.6.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.6.4 染色法

A.6.4.1 将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染 1 min，水洗。

A.6.4.2 滴加革兰氏碘液，作用 1 min，水洗。

A.6.4.3 滴加 95%乙醇脱色，约 15 s~30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗。

A.6.4.4 滴加复染液，复染 1 min。水洗、待干、镜检。

A.7 4%牛磺胆酸钠或糖发酵管

A.7.1 基础成分

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
吐温 80	0.5 ml
琼脂	1.5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1.4 ml
蒸馏水	1000 ml

A.7.2 制法

按 4%加入牛磺胆酸钠或按 0.5%加入所需糖类，并分装小试管，121 °C 高压灭菌 15 min~20 min。

A.8 精氨酸产氨

A.8.1 PY 基础培养基

A.8.1.1 成分

蛋白胨	0.5 g
胰酶解酪朊	0.5 g
酵母提取物	1.0 g

盐溶液	4.0 ml
-----	--------

蒸馏水	100 ml
-----	--------

A.8.1.2 盐溶液

无水氯化钙	1.0 g
-------	-------

七水硫酸镁	0.48 g
-------	--------

磷酸氢二钾	1.0 g
-------	-------

磷酸二氢钾	1.0 g
-------	-------

碳酸氢钠	10.0 g
------	--------

氯化钠	2.0 g
-----	-------

蒸馏水	1000 ml
-----	---------

A.8.1.3 制法

A.8.1.4.1 将无水氯化钙和七水硫酸镁混合溶解于 300 ml，再加 500 ml 水，一边搅拌一边加入其它盐类，直至全部溶解，加入 200 ml 水，混合均匀，即为盐溶液；存于 4℃，备用。

A.8.1.4.2 将 4.0 ml 盐溶液加至 A.8.1.1 中其它成分组成的溶液，121℃ 高压灭菌 15 min~20 min。

A.8.2 精氨酸溶液

A.8.2.1 成分

L-精氨酸	1.5 g
-------	-------

半胱氨酸（1 g/10 ml H ₂ O）	0.05 ml
----------------------------------	---------

蒸馏水	10 ml
-----	-------

pH 7.0±0.2

A.8.2.2 制法

将 3 滴精氨酸溶液滴入 3 ml PY 培养基中。

A.8.3 奈氏试剂

A.8.3.1 配方

A 液

氢氧化钾	20 g
------	------

蒸馏水	50 ml
-----	-------

B 液

碘化钾	5 g
-----	-----

碘化汞	10g
蒸馏水	50ml

A.8.3.2 制法

将 A 液、B 液混合、过滤，贮存于暗色瓶中。

A.8.4 接种和培养

接种试验菌至含精氨酸的培养基中，并同时接种于不含精氨酸的培养基作为对照。至室温培养 24 h~72h。

附录 B

(资料性附录)

模式菌株 ATCC 14917 的 16 S rRNA 基因序列

```

1  gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg aacgaactct ggtattgatt ggtgcttgca
61  tcatgattta cattedgagt agtggcgaac tggtagtaa cacgtgggaa acctgcccag
121 aagcggggga taacacctgg aacagatgc taataccgca taacaacttg gaccgcatgg
181 tccgagtttg aaagatggct tccgctatca cttttggatg gtcccgcggc gtattagcta
241 gatggtgggg taacggctca ccatggcaat gatacgtagc cgacctgaga gggtaatcgg
301 ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc
361 acaatggacg aaagtctgat ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaagggtt tccgctcgta
421 aaactctggt gttaaagaag aacatatctg agagtaactg ttcaggattt gacggtatth
481 aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgagg taatacgtag gtggcaagcg
541 ttgtccgat ttattggggc taaagcgagc gcaggcgggt ttttaagtct gatgtgaaag
601 ccttcggctc aaccgaagaa gtgcatcggg aactgggaaa cttgagtgca gaagaggaca
661 gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcy tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag
721 gcggctgtct ggtctgtaac tgacgctgag gctcgaagt atgggtagca aacaggatta
781 gataccctgg tagtccatac cgtaaacgat gaatgctaag tgttgagggg tttccgcct
841 tcagtgtgca agctaacgca ttaagcattc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa
901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtaggca tgtggtttaa ttcgaagcta
961 cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatac tatgcaaata taagagatta gacgttcct
1021 tccgggacat ggatacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt atcagttgcc agcattaagt tgggcaactc
1141 ggtgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaata atcatgcccc
1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggatggtaca acgagttgcy aactcgcgag
1261 agtaagctaa tctcttaaag ccattctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat
1321 gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcy gtgaatacgt tcccgggcct
1381 tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagt ttgtaacacc caaagtcggt ggggtaacct
1441 tttaggaacc agccgcctaa ggtggacaga tgat

```


《饲料添加剂 植物乳杆菌》（征求意见稿）标准编制说明

1. 任务来源

2011 年全国饲料工业标准化技术委员会下达了制订国家标准《饲料添加剂植物乳杆菌》的任务（项目编号：20110867-Q-469），由国家粮食局科学研究院提出，全国饲料工业标准化技术委员会归口，国家粮食局科学研究院、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所作为承担单位主持该标准的制订工作。

本标准是按照 GB/T1.1-2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构与编写规则》的要求进行编写的。

2. 标准的主要单位和起草人

本标准的起草单位为国家粮食局科学研究院、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。本标准的主要起草人为张晓琳、韩伟、李爱科、魏永刚、李晓敏、赵晨、黄颖、郝淑红。

3. 标准制订的必要性和意义

随着人们生活质量的提高以及全球经济一体化，动物性食品安全已成为一个世界性的挑战和全球重要的公共卫生问题。其中，抗生素残留问题是影响动物性食品安全的重要因素之一。基于对抗生素危害性的认识，“安全、绿色、环保”的新型饲用抗生素替代产品已成为饲料行业的重点发展方向。微生物饲料添加剂由于不仅具有与抗生素饲料添加剂相似的有益作用，而且还具有无毒、无副作用、无残留、无抗药性，同时也不污染环境等优点，已逐步发展成为最具有应用前景的抗生素替代产品。

植物乳杆菌，作为较早被人们利用和进入工业化的乳酸菌菌种之一；其自身的优良性能在饲料添加剂中得以体现：大量的动物实验表明，植物乳杆菌具有良好的生物安全性，同时具有促进动物生长、调整肠道菌群结构、抑制有害病原菌生长、减少疾病发生、降低仔猪腹泻率等优良特性。因此，植物乳杆菌饲料添加剂的使用能够部分或全部替代饲用抗生素，以利得到更加安全与优质的动物产品。但植物乳杆菌类产品也存在一些问题，如菌株的纯化与传代、安全性评价、存储过程中抗逆性差、货架期短、检测方法不统一，导致产品稳定性和益生特性差异

大。

目前,在中华人民共和国农业部公告 2045 号《饲料添加剂品种目录(2013)》中,允许添加的微生物共有 34 种,包括:地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、两歧双歧杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、乳酸肠球菌、嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、德式乳杆菌乳酸亚种(原名:乳酸乳杆菌)、植物乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌、产朊假丝酵母、酿酒酵母、沼泽红假单胞菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、短双歧杆菌、青春双歧杆菌、嗜热链球菌、罗伊氏乳杆菌、动物双歧杆菌、黑曲霉、米曲霉、迟缓芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、纤维二糖乳杆菌、发酵乳杆菌、德氏乳杆菌保加利亚亚种(原名:保加利亚乳杆菌)、产丙酸丙酸杆菌、布氏乳杆菌、副干酪乳杆菌、凝结芽孢杆菌、侧孢短芽孢杆菌(原名:侧孢芽孢杆菌)。2012 年,欧盟委员会发布(EU) No.93/2012 号法规,批准植物乳杆菌(DSM8862 与 DSM8866)作为所有动物饲料添加剂。然而,涉及 2045 号公告中提及的微生物相关产品,尤其是单一微生物产品(包括植物乳杆菌),大多数尚未制订国家标准。

近几年,我国微生物饲料添加剂发展非常迅速,目前已形成年总产值超过 30-50 亿元的新兴产业,其中植物乳杆菌等乳酸菌产品最受关注,需求和产值也逐年提高。但由于我国的微生物饲料添加剂市场起步较晚,还没有对其形成一个完善的管理机制,尤其是尚没有针对每类具体产品的质量标准。当前国内市场比较混乱,例如,从我们在标准研制的 3 年中采样结果来看,作为主要品质检测指标的有效活菌数,超过 50%的样品与产品标识不符。因此,相关国家标准的制订和实施,将促进微生物饲料添加剂产业的可持续健康发展,加强微生物类产品有效管理,提高动物食品安全水平具有重要意义。

4. 确定国家标准主要内容的论据和编制过程

根据全国饲料工业标准化技术委员会的文件要求及制标任务通知,国家粮食局科学研究院(第一承担单位)随即下达了关于启动制订国家标准项目的任务,组织科研攻关团队,并立项实施。

本标准立足于本行业发展现状,同时关注行业发展趋势。首先在对我国历年微生物类国标、行标、地方标准及企标汇总分析的基础上,又参考了 ISO、欧盟、

台湾等的有关产品和检测标准，以使制订的标准能与最先进标准接轨。另外，本标准制订单位分别对内蒙古、山东、上海、河南、河北等代表性厂家生产的植物乳杆菌代表性产品进行采样，并对主要指标进行检测及分析，同时我们也统计了相关质量分析数据，从有关文献及部分饲料厂汇集了一批近年的植物乳杆菌产品卫生指标及动物应用效果分析结果，以使我们制订的标准具有实用性。在此基础上形成了《饲料添加剂 植物乳杆菌》国家标准征求意见稿。

在编制过程中，我们遵循以下原则：

（1）一致性原则

本标准在编制过程中采用或参考与《微生物饲料添加剂技术通则》（NY/T 1444-2007）、《Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods》（ISO 16140）、《食品微生物指标制定和应用的原则》（GB/T 23784-2009）、《食品微生物学检验 乳酸菌检验》（GB 4789.35-2010）等标准中就有关术语和定义、技术要求、试验方法和检验原则等相一致的原则和方法，并参考了大量国标、国外标准、行标及企标中的规定；以保证本标准既吸收国内外先进经验，又便于采标单位将标准中的要求纳入已建立的质量管理体系中来。同时，在充分研究和分析基础上，综合考虑我国企业、市场、消费者及监管机构的实际情况，科学、合理地编制本标准的内容。

（2）科学实用原则

科学性体现在，系统地分析代表性产品的有效技术指标，结合生产实际应用，凝练问题及产生原因、表现形式、预防措施等，明确产品在试验方法、检验规则、判定规则、包装、运输、储存、保质期等方面的要求，为该产品设置具有适当“门槛”或“标杆”。实用性体现在，研制标准过程考虑到产品生产、储运、流通、销售和应用各个环节的实际状况，不同行业同类技术成熟程度，消费者心理预期，标准涉及的检测成本等，最终体现在本标准的征求意见稿当中。

标准研制过程所处阶段和进度如下：

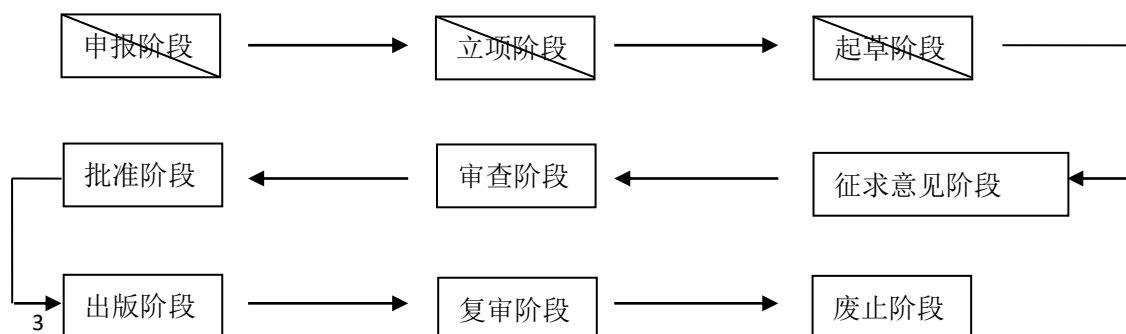


表1 标准研制工作-进度表

时间区段	工作内容
2011.7.20	成立工作小组：张晓琳、李爱科、韩伟、赵晨等，进行具体分工。
2011.8.1-2012.1.30	收集、查阅国内外相关资料、标准信息。
2012.2.1-2012.8.30	走访企业、消费者、相关专家学者，初步确定重点指标和研究思路，并重点确定标准采用的新方法及涉及新仪器，组织实验。
2012.8.22	第一次专家论证会
2011.8.1-2013.3.30.	采样阶段，采国内外的乳酸菌产品，并抽取国内有代表性的生产企业的样品。
2012.2.1-2014.5.30	试验论证和验证阶段。
2013.5.4-2013.8.30	结合试验验证、数据分析和专家意见，逐步确定标准重点考量指标。
2012.11.5-2014..4.30	广泛征求科研、生产、经营、质检及消费者的意见。
2014.6.15-2014.7.15	修改标准文本草稿，形成征求意见稿。新方法尝试。
2014.8.14-2015.4.23	再次国外内资料收集，企业电话访问。形成4次修改稿
2015.5.1-2015.11.30	形成征求意见稿。第二次专家论证会。函审等。

4.1 饲料添加剂 植物乳杆菌-采样和检测依据

根据农业部批准的获得（植物乳杆菌）饲料添加剂生产许可证的企业名单和市场直接购买方式、进行采样，共68个样品（包括同一公司不同品牌产品），如表2。其中，9个样品生产企业已停止生产或暂时不生产该类产品，8个样品生产企业联系不到。采集样品经登记、编号、取/留样、盲样跟踪等步骤后、进行初步筛选，筛选原则为：①信息有追溯性；②样品标签上明确标识“植物乳杆菌”并在实物中确实含有植物乳杆菌；③活菌数量 \geq 产品标识活菌数；④市场上有售，并具有一定代表性。经过样品的初步检验，确定13个样品为跟踪检测和评价的样品。

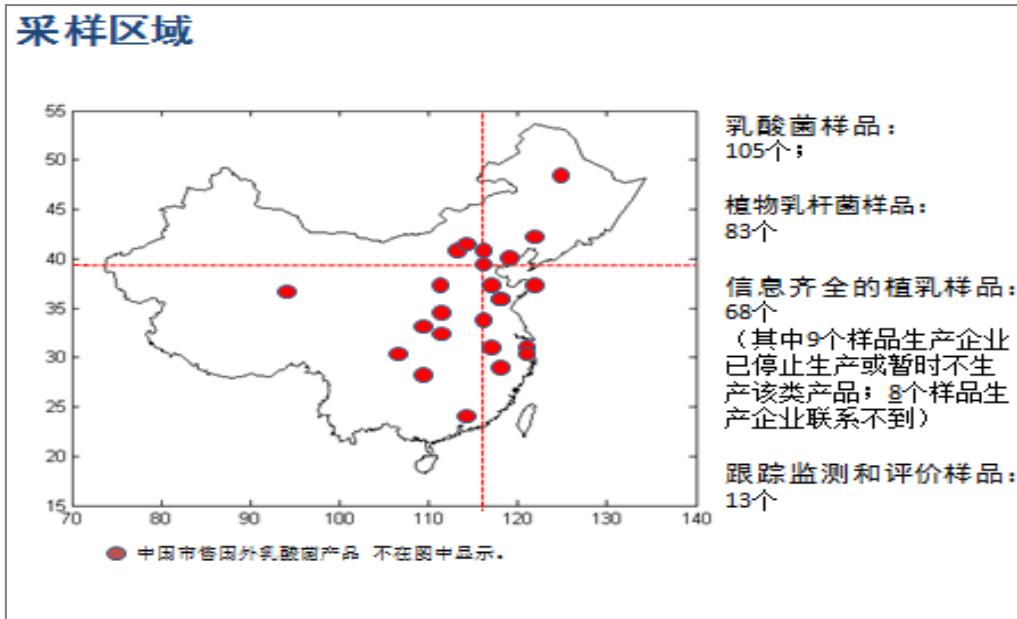


表2 (植物乳杆菌) 饲料添加剂 生产企业名录

序号	省份	生产许可证号	获证企业名称
1	山东省	饲添(2009)2688	山东寿光富士达生物科技有限公司
2	河南省	饲添(2010)1064	郑州金百合生物工程有限公司
3	山东省	饲添(2010)1285	青岛绿海洋生物技术有限公司饲料厂
4	山东省	饲添(2010)1763	高唐华农生物工程有限公司
5	内蒙古自治区	饲添(2010)2774	内蒙古普泽生物制品有限责任公司
6	内蒙古自治区	饲添(2010)2857	内蒙古林泰生物科技发展有限公司
7	广东省	饲添(2010)2889	开平柏丽宝生物化学有限公司
8	湖南省	饲添(2011)1879	长沙蓝马生物饲料有限公司
9	辽宁省	饲添(2011)1986	沈阳丰美生物技术有限公司
10	辽宁省	饲添(2011)2122	大连三科生物工程有限公司
11	河北省	饲添(2011)3044	河北康达利药业有限公司
12	广东省	饲添(2011)3051	广州正无穷生物科技有限公司

13	山东省	饲添（2012）0662	青岛兴业生物工程有限公司
14	辽宁省	饲添（2012）2168	沈阳金科丰牧业科技有限公司
15	黑龙江省	饲添（2012）2316	哈尔滨中科生物工程有限公司
16	河北省	饲添（2012）3106	奥玛（唐山）生物工程有限公司
17	山东省	饲添（2012）3126	山东宝来利来生物工程股份有限公司
18	河北省	饲添（2012）3162	衡水鑫明科技有限公司
19	山东省	饲添（2006）2073	山东康地恩生物科技有限公司
20	重庆市	饲添（2008）2403	重庆优宝生物技术有限公司
21	上海市		润盈生物工程（上海）有限公司
22	河北省		沧州旺发生物技术研究所
23	北京市	饲添（2010）2774	北京和美科盛生物技术有限公司
24	江苏省		台湾生合生物科技股份有限公司、芯来旺生物科技（南京）有限公司
25	上海市		紫石生物集团

表3 跟踪检测和评价的样品

内部编号	品名	厂家	主要成分	备注
5	多利菌宝	山东康地恩生物科技股份有限公司	嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、尿肠球菌	同时进行：国标草案方法对多菌株区分试验。
11	优长素	重庆优宝生物技术有限公司	乳杆菌、酵母菌、芽孢杆菌、菌体蛋白、生物活性肽、酵母多糖	同时进行国标草案方法对多菌株区分试验。
16	产酶益生菌.群康（103 畜禽通用）	山东宝来利来生物工程股份有限公司	2 株高酶活性枯草芽孢杆菌、乳酸片球菌、植物乳杆菌及其代谢产物	同时进行：①同厂家不同品牌产品稳定性试验；②国标草案方法对多
17	植物乳杆	山东宝来利来生物工程	植物乳杆菌及其代谢产物	菌株区分试验。

	菌	程股份有限公司	载体等	
19	润盈植物乳杆菌 200 亿	润盈生物工程（上海）有限公司	植物乳杆菌	
20	普泽植物乳杆菌	内蒙古普泽生物制品有限责任公司	植物乳杆菌	
22	旺发植物乳杆菌	沧州旺发生物技术研究所	植物乳杆菌	
26	润盈发酵包	润盈生物工程（上海）有限公司	植物乳杆菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌	同时进行：国标草案方法对多菌株区分试验。
29	青贮邦	北京和美科盛生物技术有限公司	干燥植物乳杆菌	同时进行：①同厂家不同品牌产品稳定性试验；②国标草案方法对多菌株区分试验。
32	乳安邦	北京和美科盛生物技术有限公司	干酪乳杆菌、植物乳杆菌	
33	发菌邦	北京和美科盛生物技术有限公司	干酪乳杆菌、植物乳杆菌	
34	芯来旺	台湾生合生物科技股份有限公司、芯来旺生物科技（南京）有限公司	植物乳杆菌	
35	紫石	紫石生物	植物乳杆菌	

4.2 饲料添加剂 植物乳杆菌-术语和定义的编制依据

主要参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等）、《常见细菌系统鉴定手册》（东秀珠、蔡妙英等）相关植物乳杆菌的鉴定部分。

4.3 饲料添加剂 植物乳杆菌-微生物形态的编制依据

4.3.1 菌体形态

参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》（R.E.布坎南，N.E.吉本斯等，809页）、《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》（凌代文，6-16页），并经过对植物乳杆菌标准

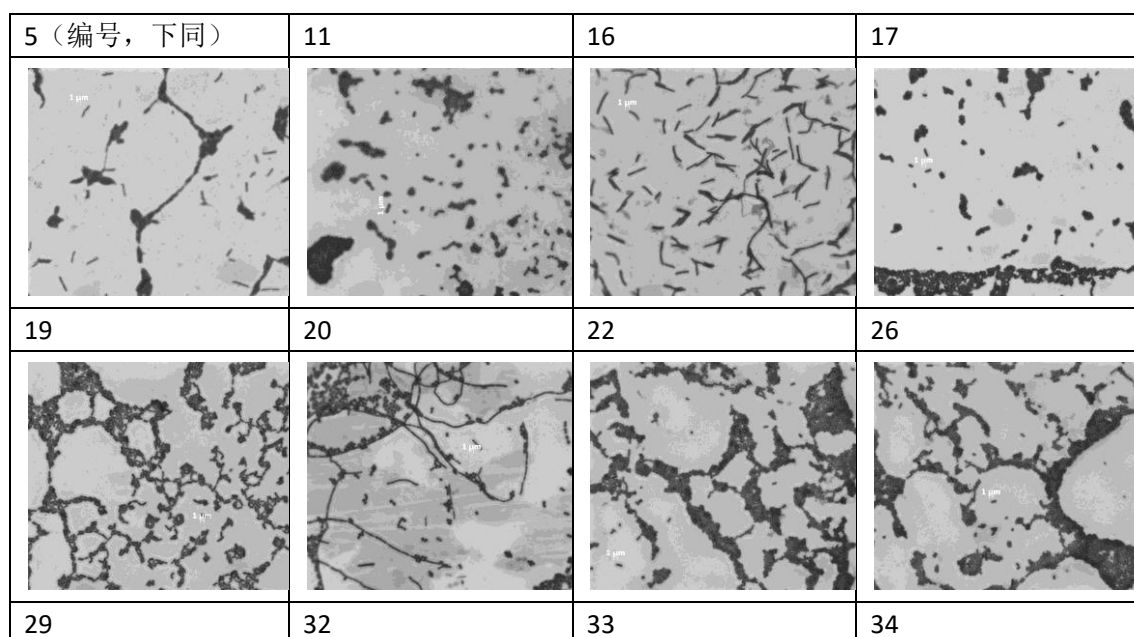
菌株和样品的革兰氏染色和显微观察，确定植物乳杆菌的菌体形态为：菌体细胞呈圆端直杆状，通常0.9~1.2 μm宽，3~8 μm长，单个、成对或成短链

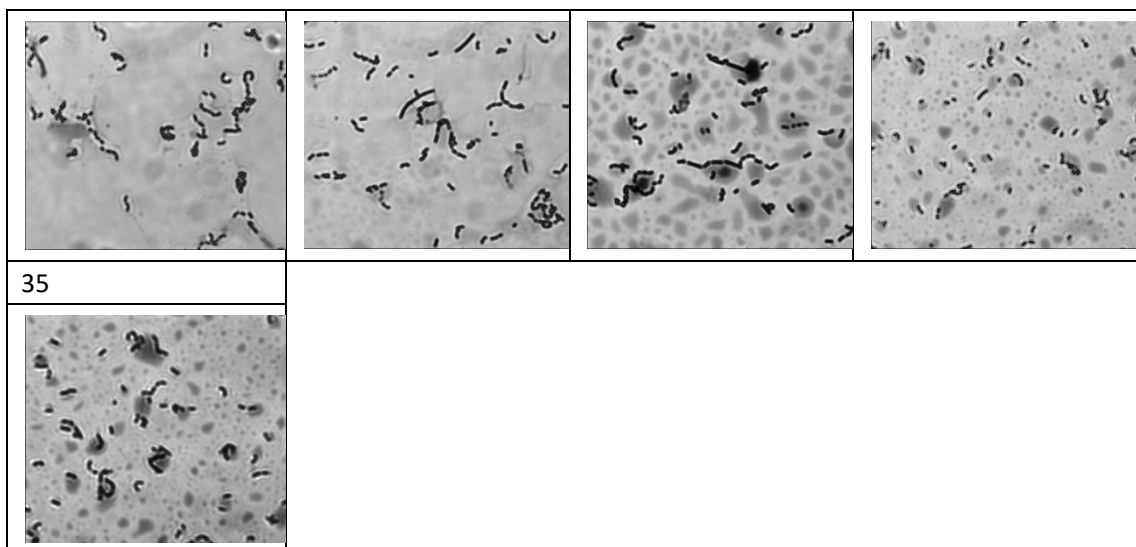
表4 跟踪检测和评价的样品-特征描述

编号	形态	革氏染色 ^a	芽孢	荚膜	鞭毛
5	直杆、短链	阳性	无	无	无
11	直杆、单个	阳性	无	无	无
16	直杆、单个	阳性	无	无	无
17	直杆、单个	阳性	无	无	无
19	直杆、单个	阳性	无	无	无
20	直杆、短链	阳性	无	无	无
22	直杆、单个	阳性	无	无	无
26	直杆、单个	阳性	无	无	无
29	直杆、短链	阳性	无	无	无
32	直杆、单个	阳性	无	无	无
33	直杆、短链	阳性	无	无	无
34	直杆、单个	阳性	无	无	无
35	直杆、短链	阳性	无	无	无

a:革兰氏染色部分为生理生化特征，放在标准中4.1.3。

图1 跟踪检测和评价样品显微形态





4.3.2 菌落形态

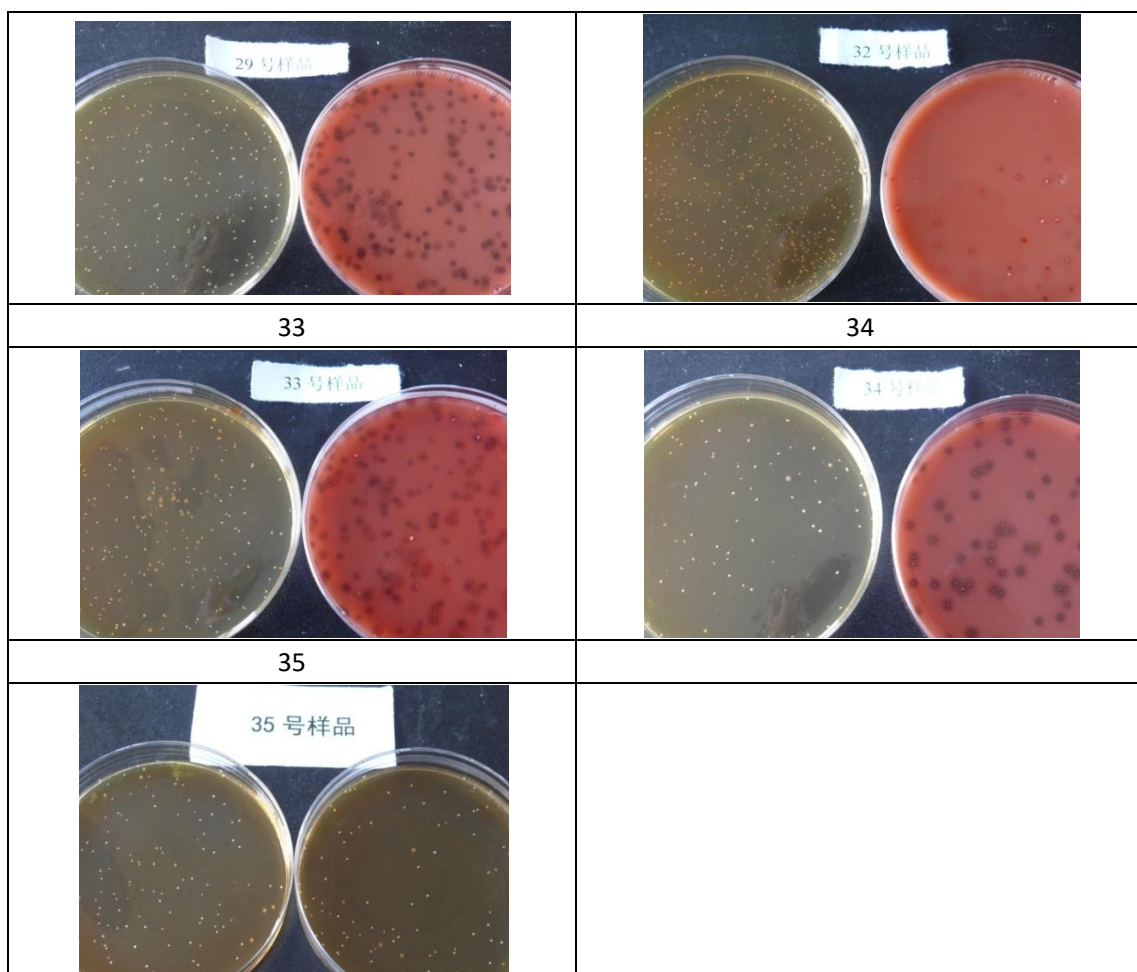
参考国家标准《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》(凌代文, 6-16页)、《食品卫生微生物学检验 乳酸菌饮料中乳酸菌检验》(GB/T4789.35)、《进出口食品中乳酸菌检验方法 第1部分: 分离与计数方法》(SN/T1941.1-2007)及数十篇乳酸菌文献, 选用适合乳酸菌的培养基为国标草案中分离用培养基, 见表5。跟踪检测的样品在下述培养基上培养(37℃±2℃, 24-48h), 菌落形态均符合典型特征, 如图3。

表5 适合乳酸菌的培养基及相应菌落形态

培养基名称	菌落形态
改良TJA	平皿底为黄色, 菌落中等大小, 微白色, 湿润, 边缘不整齐, 直径3mm±1mm, 如棉絮团状菌落
改良MC	平皿底为粉红色, 菌落较小, 圆形, 红色, 边缘似星状, 直径2mm±1mm, 可有淡淡的晕
MRS	平皿底为黄色, 菌落中等大小, 圆形, 白色, 湿润, 凸起, 边缘整齐, 直径为3mm±1mm

图2 部分样品菌落形态

29 (编号, 下同)	32
-------------	----



4.3.3 生理生化特征

主要参考《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》(R.E.布坎南, N.E.吉本斯等, 809-811页)。凡在改良 TJA 或改良 MC 琼脂斜面上, 于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$, 24h~48h 培养, 刮取菌苔, 进行表 6 中试验, 以验证植物乳杆菌生理生化特征; 包括革兰氏染色、4% 牛磺胆酸钠的耐受性实验、利用精氨酸产氨及利用不同碳源实验。

表 6 植物乳杆菌生理生化特征

特征	结果	特征	结果
革兰氏染色	+	蔗糖	+
4%牛磺胆酸钠	+	麦芽糖	+
精氨酸产氨	-	甘露醇	+
碳水化合物反应		水杨苷	+
七叶苷	+	山梨醇	+
纤维二糖	+	棉籽糖	+

注：+为阳性反应；-为阴性反应。

图3 部分样品革兰氏染色结果




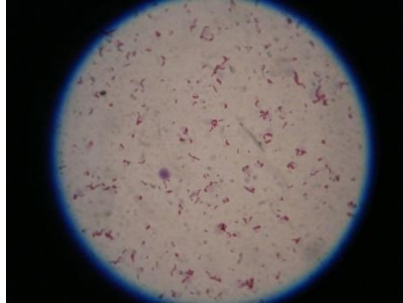
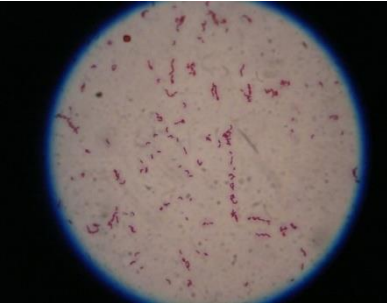
29 (编号, 下同)	32
	
33	34
	
35	
	

图4 跟踪检测样品的生理生化反应结果

5-26 号精氨酸产氨实验	29-35 号精氨酸产氨实验
---------------	----------------

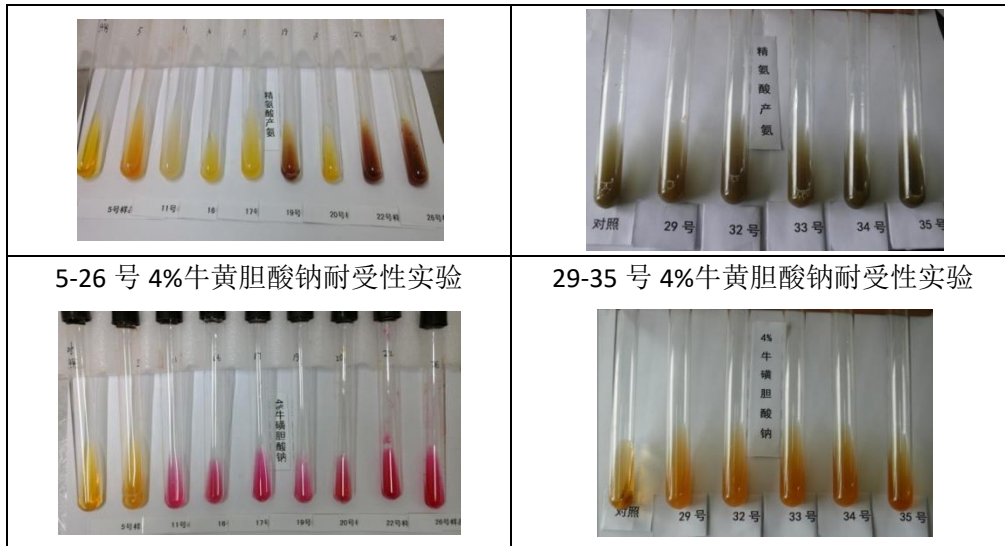


表7 跟踪检测样品的生理生化结果描述

编号	七叶 苷	纤维二 糖	麦芽 糖	甘露 醇	水杨 苷	山梨 醇	蔗 糖	还 原 硝 酸 盐 ^a	4% 牛 磺 胆 酸钠	精氨 酸产 氨	15 °C 生 长 ^b
5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
11	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
16	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
17	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
19	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
20	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
22	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
26	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
29	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
32	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
33	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
34	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
35	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

a,b: 两项特征试验最终未列入标准的征求意见稿。

4.4 饲料添加剂 植物乳杆菌-感官特征的编制依据

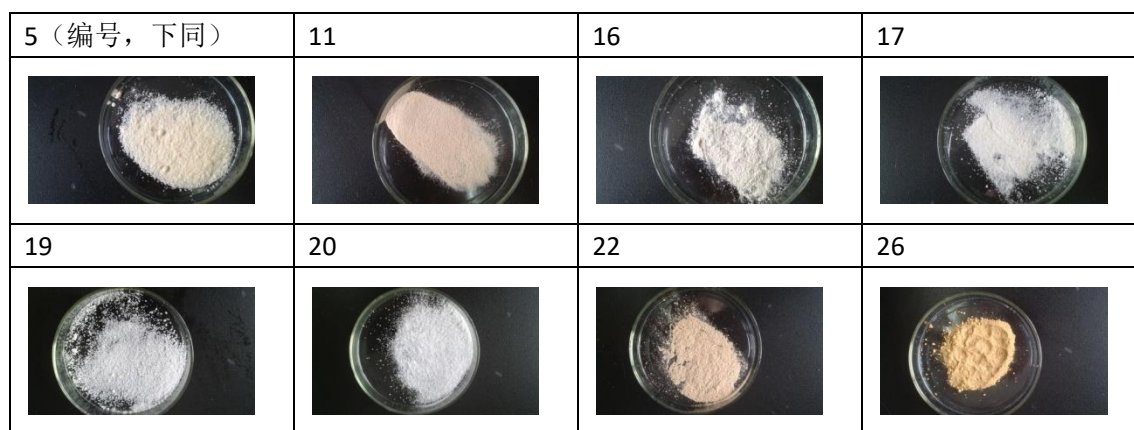
目前，市场在售的乳酸菌类饲料添加剂大多为固态产品，在我们收集的样品中，只有 2 个为液态产品。从溶解性分析，水溶性产品居多，不乏肠溶性产品。

从形态分析，存在冻干菌粉、湿法造粒、载体吸附菌粉等，且粒度在 20-100 目范围，颜色都很均一。在标准草案中的表述为：“产品性状应符合包装上标明的产品固有的形状、色泽、气味、均匀程度、杂质等，无异臭味。”

表8 跟踪检测样品的感官特征

编号	粒度 (目/微米)	形状	色泽	均匀程度	有无刺激 气味	有无杂质
5	50/297	粉末	亮黄	均匀	无	无
11	80/178	粉末	淡黄	均匀	无	无
12	50/297	粉末	淡黄	均匀	无	无
16	80/178	粉末	灰白	均匀	无	无
17	50/297	粉末	淡黄+白	均匀	无	无
19	50/297	颗粒	白	均匀	无	无
20	60/250	粉末	白	均匀	无	无
22	50/297	粉末	淡黄	均匀	无	无
26	60/250	颗粒+粉末	颗粒：白 粉末：黄	均匀	无	无
29	45/355	粉末	白	均匀	无	无
32	45/355	粉末	淡黄	均匀	无	无
33	50/297	粉末	淡黄	均匀	无	无
34	50/297	粉末	淡黄	均匀	无	无
35	50/297	粉末	白	均匀	无	无

图5 跟踪检测样品的感官图示



4.5 饲料添加剂 植物乳杆菌-水分的编制依据

对收集的所有完整包装的固态样品的水分含量的测定：称取 2.00~10.0g 切碎或磨细的样品，精密称量后放入置 95~105℃干燥箱中，瓶盖斜支于瓶边，干燥 2~4h 后，盖好取出，放入干燥器内冷却 0.5h 后称量。然后再放入 95~105℃干燥箱中干燥 1h 左右，取出，放干燥器内冷却 0.5h 后再称量。至前后两次质量差不超过 2mg，即为恒量。结果表明：所收集的完整包装的固态样品的水分含量在 4.8%-7.5% 区间内。另外，随机挑选 1 个样品，调节不同水分（6% 和 12%），贮存不同时间（3、6、12 月），结果发现高水分样品中，随水分提高和时间延长，霉菌总量也显著增加。考虑到商品加工、流通、储藏、使用过程中可能带来的误差和水分增加，标准草案中的表述为：“不高于 8.0%。”

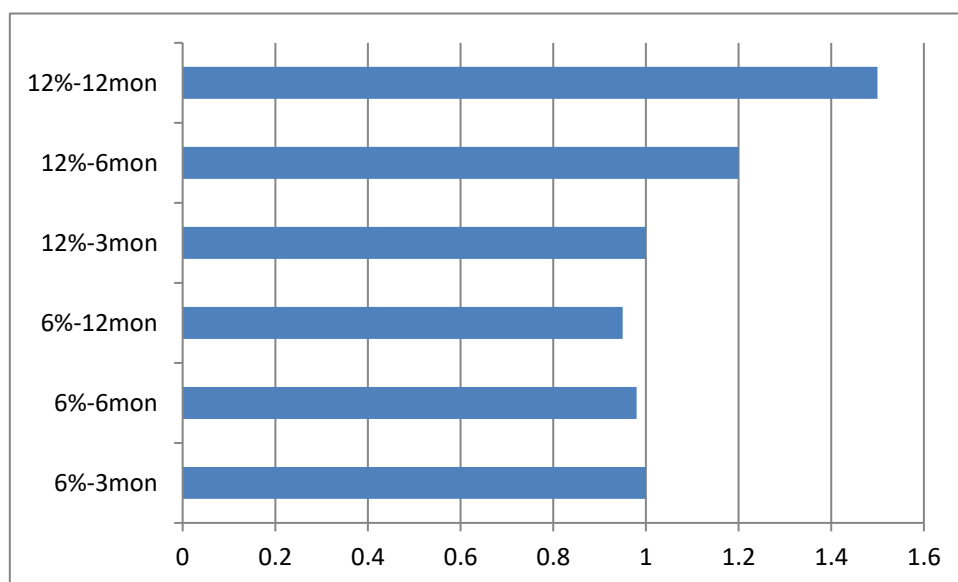


图 6 随机样品调节不同水分—霉菌生长情况（纵坐标：水分%+月数；横坐标：霉菌增长倍数，以 1.0×10^4 CFU/g 设为 1）

表9 跟踪检测样品水分检测结果

编号	样品 1/%	样品 2/%	样品 3/%	平均值/%	标准差
5	6.13	6.18	6.14	6.15	0.03
11	5.81	5.82	5.82	5.82	0.01
16	4.89	4.84	4.86	4.86	0.03
17	5.55	5.53	5.58	5.55	0.03
19	6.12	6.11	6.11	6.11	0.01
20	7.14	7.17	7.14	7.15	0.02

22	4.04	4.07	4.05	4.05	0.02
26	6.06	6.05	6.05	6.05	0.01
29	7.56	7.57	7.54	7.56	0.02
34	7.04	7.01	7.03	7.03	0.02

4.6 饲料添加剂 植物乳杆菌-活菌数的编制依据

活菌数，是益生菌在最重要的功能性指标之一；在 FAO/WHO 和欧盟对益生菌的定义中，均强调“足够数量”的必要性。所以说，活菌数的高低关系到产品的质量。目前，针对植物乳杆菌的活菌数在 ISO 标准、国标、行标中尚无强制规定，但乳酸菌在食品、保健食品中相关规定、及微生物饲料添加剂产品的文献中数据都值得借鉴。在国标《发酵乳》（GB19302-2010）、《乳酸菌饮料卫生标准》（16321-2003）、《婴儿配方食品》（GB10765 - 2010）、《较大婴儿和幼儿配方食品》（GB10767 - 2010）、《婴幼儿谷类辅助食品》（GB10769 - 2012）等均明确：产品中活性益生菌的活菌数应 $\geq 10^6$ CFU/g(ml)。而在大量代表性杂志文献中（包括《Animal Science》、《动物学报》、《动物学杂志》、《动物营养学报》等），微生物饲料添加剂的有效活菌浓度大多在 10^7 - 10^{10} 范围内。从植物乳杆菌的菌种特征、发酵规律、工业成熟度分析，饲料添加剂从业者自微生物发酵、离心收集、冻干处理或加载体复配、干燥等步骤后，得到大于 1.0×10^{10} CFU/g 的菌粉是完全可以达到的。同时，从收集样品的标识和实际检验来看，85%的（乳酸菌）样品的初始活菌数大于 1.0×10^9 CFU/g，且使用浓度均要求或建议在 1.0×10^6 CFU/g（饲料）以上。所以，考虑到行业平均加工水平、有效使用浓度、市场实际情况，并本着促进行业发展、对从业者提高“适当门槛”的原则，标准草案提出：植物乳杆菌活菌数 $\geq 1.0 \times 10^9$ CFU/g。

表10 跟踪检测样品的标识活菌数

编号	标识活菌数，CFU/g	初检活菌数*，CFU/g
5	$\geq 1 \times 10^9$ （复合菌组成）	1.0×10^8
11	$\geq 1.51 \times 10^{13}$ （复合菌组成）	1.0×10^{10}
16	$\geq 2.0 \times 10^8$ （复合菌组成）	1.0×10^6
17	2.0×10^{10}	2.28×10^{10}

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/616221030142010155>