

ICS 65.120

B 20



# ZZB

## 浙江制造团体标准

T/ZZB 0261—2017

### 饲料添加剂 溶菌酶

Feed additive lysozyme

ZHEJIANG MADE

2017 - 10 - 18 发布

2017 - 10 - 31 实施

浙江省浙江制造品牌建设促进会

发布



## 目 次

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 前言 .....                          | II |
| 1 范围 .....                        | 1  |
| 2 规范性引用文件 .....                   | 1  |
| 3 术语和定义 .....                     | 1  |
| 4 产品分类及用途 .....                   | 2  |
| 5 基本要求 .....                      | 2  |
| 6 技术要求 .....                      | 3  |
| 7 试验方法 .....                      | 4  |
| 8 检验规则 .....                      | 5  |
| 9 包装、标识、运输、贮存和保质期 .....           | 6  |
| 10 质量承诺与服务 .....                  | 6  |
| 附录 A（规范性附录） 最小抑菌浓度（MIC）测定方法 ..... | 7  |

ZHEJIANG MADE

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

请注意本标准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。

本标准有浙江省浙江制造品牌建设促进会提出并归口。

本标准由浙江蓝箭万帮标准技术有限公司牵头组织制订。

本标准主要起草单位：浙江艾杰斯生物科技有限公司。

本标准参与起草单位：中国计量大学、杭州康源饲料科技有限公司、浙江省畜牧技术推广站（排名不分先后）。

本标准主要起草人：潘宏涛、卢亚萍、陈生红、潘洪联、贾晓龙、刘欣、李奎、朱盛霞、郑玲、季立新。

本标准由浙江蓝箭万帮标准技术有限公司负责解释。

ZHEJIANG MADE

# 饲料添加剂 溶菌酶

## 1 范围

本标准规定了饲料添加剂溶菌酶的产品分类及用途、基本要求、技术要求、试验方法、检验规则及包装、标识、运输、贮存和保质期以及质量承诺与服务。

本标准适用于微生物源经发酵、提取、精制或以溶菌酶为原料复配载体等工艺制得的饲料添加剂溶菌酶。

## 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 191—2008 包装储运图示标志
- GB 1886.257—2016 食品安全国家标准 食品添加剂 溶菌酶
- GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数的测定
- GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 4789.10—2016 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 金黄色葡萄球菌定性检验
- GB 4789.15—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数 霉菌和酵母平板计数法
- GB 4789.38—2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数
- GB 5009.3—2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定 直接干燥法
- GB 5009.4—2016 食品安全国家标准 食品中灰分的测定 食品中总灰分的测定
- GB/T 5917.1—2008 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法
- GB/T 6435—2014 饲料中水分的测定 直接干燥法
- GB 10648—2013 饲料标签
- GB/T 13079—2006 饲料中总砷的测定 硼氢化物还原光度法
- GB/T 13080—2004 饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
- GB/T 13082 饲料中镉的测定方法
- GB/T 14699.1 饲料 采样
- NY/T 722—2003 饲料用酶制剂通则
- JJF1070 定量包装商品净含量计量检验规则

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

### 3.1

### 精制产品

指发酵液通过分离、浓缩提纯、干燥后获得的产品。

### 3.2

### 复配产品

指由精制产品与按比例添加饲料用载体组成的产品。

### 3.3

### 液体产品

指发酵液通过分离、浓缩提纯获得的产品。

## 4 产品分类及用途

产品分类及用途见表1。

表1 产品分类及用途

| 产品分类 |      | 用途              | 功效                  | 用量           |
|------|------|-----------------|---------------------|--------------|
| 固体产品 | 精制产品 | 在饲料中作为添加剂使用     | 提高生产性能<br>增强动物机体免疫力 | (10~100) g/t |
|      | 复配产品 | 在饲料中作为添加剂使用     |                     | (0.1~5) kg/t |
| 液体产品 |      | 在畜牧养殖过程中作为添加剂使用 |                     | (5~20) ml/头  |

## 5 基本要求

### 5.1 原材料

- 5.1.1 使用的菌株应具有国家菌株保藏机构提供的鉴定证明；采用6代以内的菌株用于实际生产。
- 5.1.2 精制产品、液体产品的所有生产原材料要求应符合食品级及以上。
- 5.1.3 复配产品中所使用的载体要求应符合饲料级及以上。

### 5.2 生产技术

- 5.2.1 采用分子生物学技术，经过液体深层高密度发酵、膜分离、精制等，形成规模化生产工艺。
- 5.2.2 发酵过程选用高灵敏度电极在线监测，并采用智能数据采集与监视控制系统进行技术参数的实时监测与调控。
- 5.2.3 精制产品的烘干、包装工序应在10000级洁净车间内完成。液体产品应通过自动的灌装、扎盖、贴标生产线完成。
- 5.2.4 产品内包装应经消毒处理。

### 5.3 检测能力

- 5.3.1 应具备产品技术全项检测能力。
- 5.3.2 应具备产品检测的关键设备：紫外分光光度计（精度万分之一）、超净台、马弗炉、恒温摇床、恒温水箱、液相色谱仪、原子吸收分光光度计等。

## 6 技术要求

### 6.1 感官指标

6.1.1 固体：白色至浅黄色粉末。

6.1.2 液体：浅黄色至深棕色液体。

### 6.2 理化指标

应符合表2的规定。

表2 理化指标

| 项目              |                 | 要求    |         |      |        |
|-----------------|-----------------|-------|---------|------|--------|
|                 |                 | 固体    |         | 液体   |        |
|                 |                 | 精制产品  | 复配产品    |      |        |
| 酶活力/[U/mg (mL)] | ≥               | 5 000 | 500     | 250  |        |
| 抑菌浓度/(mg/L)     | 酶活力 500U/mg 时   | ≤     | 5000    | 5000 | —      |
|                 | 酶活力 250U/mL 时   | ≤     | —       | —    | 10 000 |
| 水分/(%)          | ≤               | 6.0   | 10.0    | —    |        |
| 灰分/(%)          | ≤               | 1.5   | —       | 0.3  |        |
| 粒度/(%)          | 通过 0.30mm 标准试验筛 | ≥     | 90      | —    | —      |
|                 | 通过 0.59mm 标准试验筛 | ≥     | —       | 90   |        |
| pH              |                 |       | 3.0~7.0 |      |        |

### 6.3 安全性指标

安全性指标应符合表3的规定。

表3 安全性指标

| 项目                           |   | 指标     |        |        |
|------------------------------|---|--------|--------|--------|
|                              |   | 固体     |        | 液体     |
|                              |   | 精制产品   | 复配产品   |        |
| 菌落总数/[CFU/g (mL)]            | ≤ | 50 000 | 50 000 | 50 000 |
| 霉菌和酵母/[CFU/mg (mL)]          | ≤ | 0.1    | 10     | 100    |
| 大肠埃希氏菌/[MPN/g (mL)]          | ≤ | 3.0    | 20.0   | 3.0    |
| 沙门氏菌, 25 g (mL)              |   | 不得检出   | 不得检出   | 不得检出   |
| 金黄色葡萄球菌, 25 g (mL)           |   | 不得检出   | 不得检出   | 不得检出   |
| 铅(以 pb 计), (mg/kg) 或 (mg/L)  | ≤ | 2.0    | 10.0   | 2.0    |
| 总砷(以 As 计), (mg/kg) 或 (mg/L) | ≤ | 1.0    | 3.0    | 1.0    |
| 镉(以 cd 计), (mg/kg) 或 (mg/L)  | ≤ | —      | 0.5    | —      |

### 6.4 净含量

应符合国家质量监督检验检疫总局第75号令《定量包装商品计量监督管理办法》。

## 7 试验方法

### 7.1 感官

7.1.1 固体：取适量试样，放置于白瓷盘中，在自然光线下，观察试样的色泽和状态。

7.1.2 液体：取适量试样，放置于锥形瓶中，在自然光线下，观察试样的色泽和状态。

### 7.2 酶活力

#### 7.2.1 一般规定

依据GB 1886.257—2016附录A 中A.2的规定调整如下执行。

#### 7.2.2 精制产品试样溶液的制备

称取100mg左右试样，置于烧杯中，加入磷酸缓冲溶液100ml充分溶解，溶液倒入1000ml容量瓶中，再用磷酸缓冲液反复冲洗烧杯，洗液合并于容量瓶内定容。

#### 7.2.3 复配产品试样溶液的制备

称取1g左右试样，置于烧杯中，加入磷酸缓冲溶液100ml充分溶解（如载体为糠饼粉，需先放入研钵中加入少量磷酸缓冲溶液研磨），溶液倒入1000ml容量瓶中，再用磷酸缓冲液反复冲洗烧杯（研钵），洗液合并于容量瓶内定容。

#### 7.2.4 液体产品试样溶液的制备

液体产品不需要提前处理，直接检测。

### 7.3 抑菌浓度

按临床实验室标准研究所（CLSI）的“最小抑菌浓度（MIC）测定方法”进行。具体见附录A。

### 7.4 水分的测定

精制产品按GB 5009.3—2016中的第一法规定进行；复配产品按GB 6435-2014中的8.1规定进行。

### 7.5 灰分的测定

按GB 5009.4—2016中的第一法规定进行。

### 7.6 粒度的测定

按GB/T 5917—2008中的规定进行。其中：精制产品使用0.30mm标准试验筛；复配产品使用0.59mm试验筛。

### 7.7 pH的测定

按GB 1886.257—2016中附录A.3的规定进行。

### 7.8 菌落总数的测定

按GB 4789.2中的规定进行。

### 7.9 霉菌和酵母计数

按GB 4789.15—2016 中的规定进行。

#### 7.10 大肠埃希氏菌的测定

按GB 4789.38—2012中的规定进行。

#### 7.11 沙门氏菌的测定

按GB 4789.4中的规定进行。

#### 7.12 金黄色葡萄球菌的测定（定性检验）

按GB 4789.10—2016中的第一法规定执行。

#### 7.13 铅的测定

按GB 13080—2004中的规定进行。

#### 7.14 总砷的测定

按GB/T 13079—2006中的6. 砷氢化物还原光度法规定进行。

#### 7.15 镉的测定

按GB/T 13082中的规定进行。

#### 7.16 净含量

按JJF1070中的规定执行。

### 8 检验规则

#### 8.1 组批

同一工艺、同一发酵罐（或同一混合设备）生产的质量均一的产品为一批。

#### 8.2 取样与抽样

8.2.1 采用适宜的方法保证取样具有代表性，保证取样部位和取样瓶的清洁。对于微生物试验的取样，应使用无菌操作。

8.2.2 按 GB/T 14699.1 中的规定执行，取样总量不少于 200 g（或 200 ml）。

#### 8.3 出厂检验

8.3.1 产品出厂前，应由生产厂的质量部门，按产品标准规定逐批检验，并签发质量合格证的产品，方可出厂。

8.3.2 出厂检验项目为感官、酶活力、水分（固体）、pH 值。

#### 8.4 型式检验

检验项目为本标准要求中规定的全部项目。一般情况下，型式检验半年进行一次。有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

a) 新产品鉴定时；

- b) 产品的工艺、原材料或设备有较大改变与变化时;
- c) 正常生产的产品停产 3 个月后, 重新恢复生产时;
- d) 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时;
- e) 国家质量监督检验机构进行抽检时。

## 8.5 判定规则

8.5.1 出厂检验项目结果全部合格, 则判定该批产品出厂检验合格, 准予出厂。若感官、酶活力、水分(固体)、pH 值中有一项不合格, 则允许进行加倍抽样进行复验, 复检结果合格, 则判定该批产品合格; 若复检结果仍有一项不合格, 则判定该批次产品为不合格。

8.5.2 型式检验项目全部合格, 则判定为型式检验合格。

## 9 包装、标识、运输、贮存和保质期

### 9.1 包装

包装容器应整洁、卫生、无破损, 并应符合相应的规定。

### 9.2 标识

包装上应有牢固清晰的标识, 内容包括: 生产厂名、生产(注册)地址、产品名称、产品使用说明、商标、规格、净含量、生产日期、保质期、执行标准号、生产许可证号、产品批准文号。包装储运标识应符合GB/T 191的规定。

### 9.3 运输

运输工具应清洁卫生。不应与有毒、有害、有腐蚀性和含有异味的物品混装、混运, 应避免受潮、受压、日晒雨淋。装卸时, 应轻拿轻放, 不得直接钩扎外包装。

### 9.4 贮存和保质期

9.4.1 本品应储存在通风、干燥、避光处, 不应与有毒有害物质混淆。

9.4.2 在规定的包装、贮存条件下, 原包装保质期为 12 个月。

## 10 质量承诺与服务

10.1 本产品应具有可追溯性。

10.2 产品质量有异议的, 应在 24 小时内作出处理响应, 及时为用户提供 解决方案。

10.3 在正常运输、贮存的情况下, 在产品保质期内属产品质量问题的, 应提供免费退换货服务。

10.4 根据客户需求, 及时免费提供产品技术培训, 开展售后技术服务。

10.5 定期组织相关人员进行跟踪服务, 及时了解用户对产品质量的信息反馈, 做到及时采取措施, 及时整改。

附 录 A  
(规范性附录)  
最小抑菌浓度 (MIC) 测定方法

### A.1 SOP原理

不同浓度溶菌酶对定量稳定状态的指示菌在一定时间内具有抑制作用, 设置不同抑菌浓度, 检测指示菌是否大量繁殖 (试管清澈或浑浊), 以判断当前实验样品的抑菌能力。

### A.2 仪器

培养箱、滤头 (0.22  $\mu\text{m}$ )、显微镜、摇床、大量试管 (具塞)、灭菌锅、超净台、移液枪等。

### A.3 试剂

指示菌样液、封装好的培养基、制备好的样品。

### A.4 操作步骤

#### A.4.1 样品制配

##### A.4.1.1 主要设备

培养箱、滤头 (0.22  $\mu\text{m}$ )

##### A.4.1.2 溶解

称取2 g粉样, 用20 mL肉汤培养基溶解, 在37  $^{\circ}\text{C}$  环境中缓释并维持1 h以上, 溶解稀释倍数记为A。

注: A为溶解稀释倍数。

##### A.4.1.3 过滤1

使用0.22  $\mu\text{m}$ 滤头过滤除菌 (室外操作、降低无菌过滤操作压力)。

##### A.4.1.4 主动稀释

由于样品抑菌能力太强, 需要用肉汤主动稀释, 稀释倍数记为B。

注: B为主动稀释倍数

##### A.4.1.5 过滤2

使用0.22  $\mu\text{m}$ 滤头过滤除菌 (无菌操作, 滤头需要包裹灭菌)。

#### A.4.2 指示菌制备

##### A.4.2.1 主要设备

紫外分光光度计、显微镜、摇床。

#### A. 4. 2. 2 操作

需要在无菌环境下，取 0.5 mL 的指示菌接种到 50 mL 肉汤培养基中，37 °C 培养12h 后得到一定浓度的指示菌母液，将该母液用肉汤培养基稀释m倍，使OD600检测值落入0.08~0.1之间，镜检计算得到当前的指示菌浓度 C (m)，然后再稀释n倍，使 C (m) 倍的指示菌浓度变成 C (n) = 2 × 10<sup>6</sup>，工作浓度为1 × 10<sup>6</sup>。

注：多次操作，确定 C (m)、n，每次操作调节m 即可。

#### A. 4. 3 培养基分装

##### A. 4. 3. 1 设备

移液枪、大量试管、灭菌锅。

##### A. 4. 3. 2 操作

准备10只试管，各试管除第1根试管4.8 mL外，其余9根试管均装液（肉汤培养基）3.0 mL，灭菌备用。

#### A. 4. 4 样品梯度操作

##### A. 4. 4. 1 设备

超净台、移液枪等。

##### A. 4. 4. 2 操作

操作步骤如下：

- 在无菌环境下，取制备好的样品 1.2 mL 加入第一根试管，则一号管当前总体积为 (1.2+4.8 = 6) mL，移液枪反复吞吐 3 次（此处的稀释倍数记为 C1）；
- 吸取第一根试管当前混合液 3 mL 进入第二根试管，则第二根试管当前总体积为 (3+3=6) mL，移液枪反复吞吐 3 次；
- 吸取第二根试管当前混合液 3 mL 进入第三根试管，则第三根试管当前总体积为 (3+3=6) mL，移液枪反复吞吐 3 次；
- 吸取第三根试管当前混合液 3 mL 进入第四根试管，则第四根试管当前总体积为 (3+3=6) mL，移液枪反复吞吐 3 次；
- 以此类推做到第九根试管，第九根试管多余的 3 mL 弃掉；
- 第十根试管保持不变，不添加待测样品，作为对照组。

注1：C1：过程稀释倍数（样品浓度梯度操作导致），第一根管的 C1 值等于 1/5。

注2：D：为不同浓度梯度所导致的稀释倍数  $D=2^{(1-n)}$ ；n 为试管序列号。

#### A. 4. 5 指示菌添加

##### A. 4. 5. 1 设备

超净台、移液枪等。

##### A. 4. 5. 2 操作

样品梯度操作完成后，每根试管加 3 mL 制备好的指示菌 ( $2 \times 10^6$ )，则每根试管的终体积为 (3 + 3 = 6) mL，指示菌被稀释到所规定的  $1 \times 10^6$ ，指示菌添加导致的稀释倍数  $C_2 = 1/2$ 。

对照组也需要加指示菌培养。

注： $C_2$ ：过程稀释倍数（指示菌添加导致）； $C_2 = 1/2$ 。

#### A. 4. 6 培养

##### A. 4. 6. 1 设备

培养箱

##### A. 4. 6. 2 操作

37 °C 静止培养 24 h 。

#### A. 5 检测

24 h 后以目测的方式检查各试管是否有浑浊出现，记下清浊试管分界线之清试管对应的序列号。

注：直接判断，无需摇晃弹抖。

#### A. 6 MIC 计算

计算公式：

$$\text{MIC} = A \times B \times C \times D \dots \dots \dots \text{ (A. 1)}$$

式中：

- MIC 单位：g/mL；
- A：溶解稀释倍数：常规值为 10%；
- B：主动稀释倍数：常规范围：1~1/32；
- C：过程稀释倍数： $C = C_1 \times C_2 = 1/10$ ；
- D：梯度稀释倍数： $D = 2^{(1-n)}$ ；
- n：为清试管的最大序列号。

或

$$\text{MIC} = A \times B \times C \times D \times 10^6 \dots \dots \dots \text{ (A. 2)}$$

式中：

- MIC 单位：ppm，即 mg/L；
- A：溶解稀释倍数：常规值为 10%；
- B：主动稀释倍数：常规范围：1~1/32；
- C：过程稀释倍数： $C = C_1 \times C_2 = 1/10$ ；
- D：梯度稀释倍数： $D = 2^{(1-n)}$ ；
- n：为清试管的最大序列号。