



中华人民共和国国家标准

GB 7300.501—2021

代替 GB/T 22547—2008

饲料添加剂 第5部分：微生物 酿酒酵母

Feed additives—Part 5: Live microorganisms—*Saccharomyces cerevisiae*



2021-10-11 发布

2022-11-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件为 GB 7300《饲料添加剂》的第 501 部分。GB 7300 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 L-苏氨酸(GB 7300.101)；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 甘氨酸(GB 7300.102)；
- 第 1 部分：氨基酸、氨基酸盐及其类似物 蛋氨酸羟基类似物(GB 7300.103)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 L-抗坏血酸-2-磷酸酯盐(GB 7300.201)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 维生素 D₃ 油(GB 7300.202)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱(GB 7300.203)；
- 第 2 部分：维生素及类维生素 甜菜碱盐酸盐(GB 7300.204)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 碘化钾(GB 7300.301)；
- 第 3 部分：矿物元素及其络(螯)合物 亚硒酸钠(GB 7300.302)；
- 第 4 部分：酶制剂 木聚糖酶(GB 7300.401)；
- 第 4 部分：酶制剂 植酸酶(GB 7300.402)；
- 第 5 部分：微生物 酿酒酵母(GB 7300.501)；
- 第 6 部分：非蛋白氮 尿素(GB 7300.601)；
- 第 8 部分：防腐剂、防霉剂和酸度调节剂 碳酸氢钠(GB 7300.801)；
- 第 9 部分：着色剂 β -胡萝卜素粉(GB 7300.901)；
- 第 10 部分：调味和诱食物质 谷氨酸钠(GB 7300.1001)。

本文件代替 GB/T 22547—2008《饲料添加剂 饲用活性干酵母(酿酒酵母)》，与 GB/T 22547—2008 相比，除编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了外观与性状要求(见 4.1, 2008 年版的 4.1)；
- b) 更改了酵母活细胞数的要求(见 4.3, 2008 年版的 4.2)；
- c) 更改了卫生指标(见 4.4, 2008 年版的 4.3)；
- d) 增加了酵母活细胞数检测方法的平板法(见附录 B)。

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专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出并归口。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- GB/T 22547—2008；
- 本次为第一次修订。



引 言

饲料添加剂是指在饲料加工、制作、使用过程中添加的少量或者微量物质,包括营养性饲料添加剂和一般饲料添加剂。为便于使用,按照产品类别,GB 7300《饲料添加剂》分为以下 13 个大类:

- 氨基酸、氨基酸盐及其类似物;
- 维生素及类维生素;
- 矿物元素及其络(螯)合物;
- 酶制剂;
- 微生物;
- 非蛋白氮;
- 抗氧化剂;
- 防腐剂、防霉剂和酸度调节剂;
- 着色剂;
- 调味和诱食物质;
- 粘结剂、抗结块剂、稳定剂和乳化剂;
- 多糖和寡糖;
- 其他。

本文件的产品酿酒酵母属于第 5 大类微生物,因酿酒酵母是首个发布的产品标准,所以本文件以 GB 7300.501 编号,作为 GB 7300 的第 501 部分。

饲料添加剂 第5部分：微生物 酿酒酵母

1 范围

本文件规定了饲料添加剂酿酒酵母产品的技术要求、取样、试验方法、检验规则、标签、包装、运输和贮存。

本文件适用于以酿酒酵母为菌种，经液态发酵、脱水干燥而制得的饲料添加剂酿酒酵母。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 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

GB/T 6435 饲料中水分的测定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB 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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 技术要求

4.1 外观与性状

淡黄色至淡棕黄色颗粒，具有酵母特殊气味，无腐败，无异臭味，无异物。

4.2 菌种鉴别

应符合酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的形态、生理生化和分子生物学特性。

4.3 理化指标

应符合表1的规定。

表 1 酿酒酵母的理化指标

项 目	要 求
酵母活细胞数/(CFU/g 或个/g) ^a	$\geq 8 \times 10^9$
水分/%	≤ 6.0
^a 酵母活细胞数测定方法采用附录 B 中 B.1 平板法时,单位为 CFU/g;采用 B.2 染色法时,单位为个/g。	

4.4 卫生指标

应符合表 2 的规定。

表 2 酿酒酵母的卫生指标

项 目	要 求
铅/(mg/kg)	≤ 1.5
总砷/(mg/kg)	≤ 2.0
汞/(mg/kg)	≤ 0.1
镉/(mg/kg)	≤ 0.5
沙门氏菌/25 g	不得检出

5 取样

5.1 采样原则

样品的采集应遵循随机性、代表性的原则,采样过程应遵循无菌操作程序,防止一切可能的外来污染。

5.2 采样方法

- 5.2.1 应在同一批次产品中采集样品,每件样品的采样量应满足微生物指标检验的要求,一般不少于 500 g。
- 5.2.2 独立包装小于、等于 500 g 的产品,取完整包装。
- 5.2.3 独立包装大于 500 g 的产品,应用无菌采样器从同一包装的不同部位分别采取适量样品,放入同一个无菌采样容器内作为一件样品。

5.3 采集样品的贮存和运输

- 5.3.1 应尽快将样品送往实验室检验。
- 5.3.2 应在运输过程中保持样品完整。
- 5.3.3 应在接近原有贮存温度条件下贮存样品,或采取必要措施防止样品中微生物数量的变化。

6 试验方法

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,水符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

6.1 感官检验

取适量试样置于干净白色纸片上,在自然光下观察其形态、色泽、有无杂质,嗅其气味。

6.2 菌种鉴别

按附录 A 执行,以平板法为仲裁法。

6.3 酵母活细胞数

按附录 B 执行。

6.4 水分

按 GB/T 6435 执行。

6.5 总砷

按 GB/T 13079 执行。

6.6 铅

按 GB/T 13080 石墨炉原子吸收光谱法执行。

6.7 汞

按 GB/T 13081 执行。

6.8 镉

按 GB/T 13082 执行。

6.9 沙门氏菌

按 GB/T 13091 执行。

7 检验规则

7.1 组批



以相同材料、相同的生产工艺,经连续生产或同一班次生产的同一规格的产品为一批,但每批产品不应超过 50 t。

7.2 出厂检验

外观与性状、酵母活细胞数、水分为出厂检验项目。

7.3 型式检验

型式检验项目为本文件第 4 章规定的所有项目。在正常生产情况下,每年至少进行一次型式检验。有下列情况之一时,亦应进行型式检验:

- a) 产品定型投产时;
- b) 生产工艺、配方或主要原料来源有较大改变,可能影响产品质量时;
- c) 停产 3 个月以上,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) 饲料行政管理部门提出检验要求时。

7.4 判定规则

7.4.1 所验项目全部合格,判定为该批次产品合格。

7.4.2 检验结果中有任何指标不符合本文件规定时,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文件规定,则判定该批产品不合格。沙门氏菌指标不得复检。

7.4.3 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、运输和贮存

8.1 标签

标签应符合 GB 10648 的规定。

8.2 包装

包装材料应清洁卫生、并能防污染、防潮湿、防泄漏。

8.3 运输

运输工具应清洁卫生、能防暴晒、防雨淋,不应与有毒有害的物品混装混运。

8.4 贮存

室温贮存,仓库应通风、干燥、能防暴晒、防雨淋,有防虫、防鼠设施,不应与有毒有害的物质混贮。

附 录 A

(规范性)

酿酒酵母菌种鉴别方法

A.1 形态鉴别

A.1.1 培养基

A.1.1.1 麦芽汁液体培养基:麦芽汁加水稀释至 $10^{\circ}\text{Bx} \sim 15^{\circ}\text{Bx}$ (巴林糖度计), 115°C 高压蒸汽灭菌 15 min。

A.1.1.2 麦芽汁琼脂培养基:麦芽汁加水稀释至 $10^{\circ}\text{Bx} \sim 15^{\circ}\text{Bx}$ (巴林糖度计), 加 2% 琼脂粉, 115°C 高压蒸汽灭菌 15 min。

A.1.1.3 产孢子培养基:葡萄糖 0.1%, 氯化钾 0.18%, 酵母汁 0.25%, 醋酸钠 0.82%, 琼脂 2%, 用蒸馏水配制, 装管, 115°C 高压蒸汽灭菌 15 min, 搁置斜面。

A.1.1.4 马铃薯葡萄糖琼脂培养基:去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 自来水 1 L。将马铃薯洗净, 去皮, 切成小块, 立即放入水中, 以免被氧化。煮沸 30 min, 经纱布过滤, 滤液加水至 1 L, 加入葡萄糖和琼脂, 溶解后分装三角瓶或试管, 115°C 高压蒸汽灭菌 20 min。

A.1.2 在麦芽汁液体培养基中的生长

28°C 静置培养 3 天后, 菌体在液体培养基中紧密沉淀于底部, 培养液清亮, 不形成菌膜。取少量菌体于 400 倍显微镜下观察, 细胞呈卵圆形或圆形, 单个或成双, 偶尔成簇状, 细胞芽殖。细胞长与宽之比为 $1 \sim 2$, 细胞大小分为大、中、小三型, 大型细胞大小为 $(4.5 \mu\text{m} \sim 10 \mu\text{m}) \times (7.0 \mu\text{m} \sim 21 \mu\text{m})$, 中型细胞大小为 $(3.5 \mu\text{m} \sim 8 \mu\text{m}) \times (5.0 \mu\text{m} \sim 17.5 \mu\text{m})$, 小型细胞大小为 $(2.5 \mu\text{m} \sim 7 \mu\text{m}) \times (4.5 \mu\text{m} \sim 11 \mu\text{m})$ 。

A.1.3 在麦芽汁琼脂培养基上的生长

28°C 培养 3 天后, 菌落大而湿润, 微隆起或平坦, 乳白色, 表面光滑无褶皱, 边缘整齐。

A.1.4 在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上的生长

28°C 培养 3 天后, 在马铃薯琼脂培养基上生长, 无假菌丝或是有比较发达但不典型的假菌丝。

A.1.5 在产孢子培养基上的生长

28°C 培养 3 天后, 能产生子囊孢子, 每囊有 1 个~4 个圆形光面的子囊孢子。

A.2 生理生化特性

在麦芽汁琼脂斜面上, 于 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 24 h~48 h 培养, 进行表 A.1 中的试验, 以验证酿酒酵母生理生化特性。

A.3 分子生物学鉴定

采用核酸序列分析法对菌株 rRNA 基因中 26S rDNA D1/D2 区和转录间区 ITS 序列保守性进行分析。扩增菌株 26S rDNA D1/D2 区和 ITS 序列, 与 GenBank 等国际核酸序列数据库中 *Saccharomyces cerevisiae* 序列进行同源性比较, 序列差异小于 1%, 则该菌株为酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*。

表 A.1 酿酒酵母生理生化特性

试验项目		结果	试验项目		结果
糖类发酵	葡萄糖	+	碳源利用	蜜二糖	+, -
	半乳糖	+, -		棉子糖	+, -
	麦芽糖	+, -		纤维二糖	-
	蔗糖	+, -		海藻糖	+, -
	蜜二糖	+, -		D-木糖	-
	棉子糖	+, -		山梨糖	-
	乳糖	-		乙醇	+, -
	海藻糖	+, -		甘油	+, -
	纤维二糖	-		山梨糖	-
	松三糖	+, -		赤藓醇	-
碳源利用	乳糖	-		甘露醇	-
	半乳糖	+, -		肌醇	-
	麦芽糖	+, -		熊果苷	-
	蔗糖	+, -	氮源利用	硝酸钾	-
注：+为阳性反应；-为阴性反应。					

附 录 B
(规范性)
酵母活细胞数测定方法

B.1 第一法 平板法(仲裁法)

按 GB 4789.15—2016 第一法进行检测。检测时,GB 4789.15—2016 中 5.1.1 所“加入 225 mL 无菌稀释液”的温度为 37℃~40℃。

B.2 第二法 染色法**B.2.1 原理**

活酵母能将进入细胞的次甲基蓝染色液立即还原脱色,不被染色,而死酵母被染成蓝色,通过显微镜观察即可计算活细胞数。

B.2.2 试剂或材料

B.2.2.1 无菌生理盐水:0.85%的氯化钠溶液。

B.2.2.2 次甲基蓝染色液:将 0.025 g 次甲基蓝,0.042 g 氯化钾,0.048 g 六水氯化钙,0.02 g 碳酸氢钠,1.0 g 葡萄糖,加无菌生理盐水溶解,并定容至 100 mL,密封,室温保存。

B.2.3 仪器设备

B.2.3.1 显微镜:放大倍数 400 以上。

B.2.3.2 血球计数板。

B.2.3.3 血球计数板专用盖玻片。

B.2.3.4 分析天平:精度 0.1 mg。

B.2.3.5 恒温水浴:控温精度 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

B.2.4 试验步骤

B.2.4.1 称取 0.1 g 样品,精确至 0.000 2 g,准确加入 37℃~40℃无菌生理盐水 20 mL,振荡使充分分散,置 32℃恒温水浴中活化 1 h。

B.2.4.2 将活化液振荡均匀,取酵母活化液 0.1 mL 至一试管中,加入次甲基蓝染色液 0.9 mL,摇匀,室温下静置染色 10 min。

B.2.4.3 将盖玻片置于血球计数板计数室上,使之紧紧盖在血球计数板上。取 0.02 mL 染色后的菌液(B.2.4.2)到血球计数板和盖玻片结合处,让菌液自动吸入计数室。菌液中不应有气泡,静置 1 min 后,用显微镜观察计数。

注 1: 计数板通常有两种规格:一种是 1 个大格中有 16 个中格,1 个中格又分 25 个小格,即 16×25 规格,用这种规格计数板,取左上、左下、右上、右下四个中格(即 100 个小格)进行计数。另一种是 1 个大格分为 25 个中格,一个中格分为 16 个小格,即 25×16 规格,用这种计数板,则除了左上、左下、右上、右下四个中格外,还需加中央的一个中格(即 80 个小格)进行计数。

注 2: 盖玻片放置好后不要滑动,否则细胞也会移动,滴注后计数时处于水平状态。

B.2.4.4 用 10×接物镜和 16×接目镜找出方格后,换用 40×接物镜,调整微调至视野最清晰,开始计

数,当细胞处于方格线上时,计数原则:数上不数下,数左不数右。计出芽时,超过母细胞的二分之一者按细胞计,小于二分之一者忽略不计。染为蓝色的为死细胞,无色的为活细胞,只计活细胞数。

注 1: 在显微镜下观察酿酒酵母细胞形态为细胞卵圆形或椭圆形,大小为(5 μm~7.5 μm)×(7.5 μm~10 μm),胞内可看到明显的细胞核。

注 2: 对每个样品重复计数两次,取其算术平均值。

B.2.5 结果计算

每克试样中活细胞数 X_1 ,以数量计,数值以个/g 表示,按式(B.1)计算:

$$X_1 = \frac{A \times 400 \times 10^4 \times 20 \times 10}{m \times N} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

X_1 ——每克样品中活细胞数,单位为个每克(个/g);

A ——所数小格内活细胞数,单位为个;

m ——称取样品的量,单位为克(g);

N ——所数小格数,单位为个。

取平行测定结果的算术平均值为测定结果。

B.2.6 精密度

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于其算术平均值的 10%。
