ICS 65.120

CCS B 46

GB

Государственный стандарт Китайской Народной Республики

GB 7300.501-2021

Взамен GB/T 22547-2008

Кормовые добавки

Часть 5: Микроорганизмы

Пекарские дрожжи

Дата публикации: 11.10.2021 Вступает в силу: 01.11.2022

Главным государственным управлением КНР по контролю и регулированию рынка

Государственным комитетом по стандартизации Китая

Преамбула

Настоящий стандарт составлен в соответствии с документом GB/T 1.1-2020 «Руководство по работе по стандартизации, часть 1: Структура и правила составления документов по стандартизации».

Настоящий документ является частью 501 стандарта GB 7300 «Кормовые добавки». В стандарте GB 7300 опубликованы следующие части:

- Часть 101: аминокислоты, соль аминокислоты и ее аналоги, L-треонин;
- Часть 102: аминокислоты, соль аминокислоты и ее аналоги, глицин;
- Часть 103: аминокислоты, соль аминокислоты и ее аналоги, гидроксил-аналог метионина;
- Часть 201: витамины и биостерин, L-аскорбиновая кислота-2-фосфатная соль;
- Часть 202: витамины и биостерин, масло витамина D3;
- Часть 203: витамины и биостерин, бетаин;
- Часть 204: витамины и биостерин, бетаина гидрохлорид;
- Часть 301: минеральные элементы и их комплексные соединения (хелатные соединения), йодистый калий;
- Часть 302: минеральные элементы и их комплексные соединения (хелатные соединения), селенит натрия;
- Часть 401: ферментный препарат Ксиланаза;
- Часть 402: ферментный препарат Фитаза;
- Часть 601: остаточный азот Карбамид;
- Часть 801: антисептические средства, антиплесень и регулятор кислотности Гидрокарбонат натрия;
- Часть 901: красящее средство β- каротиновый порошок;
- Часть 1001: приправы и кормовые вещества Глутомат натрия.

Настоящий документ заменяет стандарт GB/T 22547-2008 «Активные сухие дрожжи для кормовых добавок (пекарские дрожжи)», по сравнению со стандартом GB/T 22547-2008, за исключением редакционных изменений, основные технические изменения заключаются в следующем:

a) изменены требования к внешнему виду и характеристикам (см. 4.1, 4.1 в редакции 2008 г.);

b) изменены требования к количеству живых клеток дрожжей (см. 4.3, 4.2 в редакции 2008 г.);

c) изменены санитарные показатели (см. 4.4, 4.3 в редакции 2008 г.);

d) добавлен метод пластинчатых разводок для определения количества живых клеток дрожжей (см. Приложение B).

Обратите внимание, что часть содержания настоящего документа может относиться к патентам. Органы, опубликовавшие данный документ, не несут ответственность за идентификацию патентов.

Настоящий документ был предложен и находится в ведении Министерства сельского хозяйства Китайской народной республики.

Статус публикации предыдущих версий настоящего стандарта и документов, которые он заменяет, следующий:

- GB/T 22547-2008;
- данная редакция является первой.

Предисловие

Кормовые добавки относятся к небольшому или малому количеству веществ, добавляемых в процессе обработки, производства и использования кормов, включая трофические кормовые добавки и обычные кормовые добавки. В целях удобного использования в соответствии с категориями продукции GB 7300 «Кормовые добавки» подразделяются на следующие 13 основных категорий:

- аминокислоты, соль аминокислоты и ее аналоги;
- витамины и биостерин;
- минеральные элементы и их комплексные соединения (хелатные соединения);
- ферментные препараты;
- микроорганизмы;
- остаточный азот;
- антиоксиданты;
- антисептические средства, антиплесень и регуляторы кислотности;
- красящие вещества;
- приправы и кормовые вещества;
- связующие вещества, антислеживатель, стабилизаторы и эмульгаторы;
- полисахариды и олигосахариды;
- прочее.

Пекарские дрожжи в настоящем документе относятся к пятой основной категории микроорганизмов; поскольку пекарские дрожжи являются первым опубликованным стандартом на продукцию, данному документу присвоен порядковый номер GB 7300.501 в качестве части 501 к стандарту GB 7300.

Кормовые добавки. Часть 5: Микроорганизмы

Пекарские дрожжи

1. Сфера применения

Настоящий стандарт устанавливает технические требования, взятие пробы, методы тестирования, правила проверки, маркировку, упаковку, транспортировку и хранение.

Настоящий документ применим к пекарским дрожжам, являющимся штаммом, это кормовая добавка в виде пекарских дрожжей, полученная посредством жидкой ферментации, обезвоживания и сушки.

2. Нормативные ссылки

Содержание следующих документов составляет необходимые условия настоящего документа посредством нормативных ссылок в тексте. В отношении датированных ссылочных документов к настоящему стандарту применима только версия, соответствующая этой дате. В отношении недатированных ссылочных документов к настоящему стандарту применяется его последнее издание (включая все правки).

GB 4789.15–2016 Государственный стандарт безопасности пищевых продуктов. Исследование пищевой микробиологии.

GB/T 6435 Измерение влажности в корме.

GB/T 6682 Спецификация и методы тестирования воды для использования в аналитической лаборатории.

GB/T 8170 Правила округления числовых значений и индикация и определение предельного значения.

GB 10648 Этикетка корма.

GB/T 13079 Измерение содержания общего мышьяка в кормах.

GB/T 13080 Измерение содержания свинца в кормах. Атомная абсорбционная спектрометрия.

GB/T 13081 Измерение содержания ртути в кормах.

GB/T 13082 Методы измерение содержания кадмия в кормах.

GB/T 13091 Измерение содержания сальмонелл в кормах.

3. Термины и определения

Настоящий документ не содержит термины и определения, требующие определения.

4. Технические требования

4.1 Внешний вид и характеристики

Гранулы от светло-желтого до светлого желто-коричневого цвета, со специфическим запахом дрожжей, не имеют разлаганий, не имеют дурного запаха, без инородных примесей.

4.2 Дифференцирование штамма

Должны соответствовать физиологическим, биохимическим и молекулярно-биологическим свойствам и форме пекарских дрожжей.

4.3 Физико-химические показатели

Должны соответствовать требованиям таблицы 1.

Таблица 1. Физико-химические показатели пекарских дрожжей

Объект		Требования
Количество живых клеток дрожжей/(КОЕ/г или штука/г)[a]	≥	8×10^9
Влажность %	≤	6.0
Если методом измерения количества живых клеток дрожжей является метод пластинчатых разводок, указанный в Приложении B.1, единицей измерения является КОЕ/г; если методом измерения является метод окрашивания, указанный в Приложении B.2, единицей измерения является штука/г.		

4.4 Санитарные показатели

Должны соответствовать требованиям таблицы 2.

Таблица 2. Санитарные показатели пекарских дрожжей

Объект	Требования
Свинец (мг/кг)	1.5
Общий мышьяк (мг/кг)	2.0
Ртуть (мг/кг)	0.1
Кадмий (мг/кг)	0.5
Сальмонеллы, 25 г	Обнаружение не допускается

5. Взятие образцов

5.1 Принципы отбора образцов

При сборе образцов следует придерживаться принципа случайности и репрезентативности, процесс отбора проб должен соответствовать порядку асептических мероприятий для предотвращения всех возможных посторонний загрязнений.

5.2 Методы отбора образцов

5.2.1 Образцы должны быть собраны из одной и той же партии продукции, количество сбора каждого образца должно соответствовать требованиям проверки микробиологических показателей, как правило, не менее 500 г.

5.2.2 Для продуктов с индивидуальной упаковкой объемом менее или равной 500 г берется полная упаковка.

5.2.3 Для продуктов с индивидуальной упаковкой объемом более 500 г необходимо использовать асептический пробоотборник, чтобы взять достаточное количество образцов из разных частей той же самой упаковки, затем необходимо поместить в тот же самый асептический пробоотборник в качестве одного образца.

5.3 Хранение и транспортировка собранных образцов

5.3.1 Необходимо как можно скорее отправлять образцы в лабораторию для проверки.

5.3.2 Во время транспортировки образцы должны оставаться неповрежденными.

5.3.3 Образцы следует хранить в условиях, близких к исходной температуре хранения, или следует принять необходимые меры для предотвращения изменения количества микроорганизмов в образцах.

6. Методы испытаний

Если не указано иное, в анализе используются реактивы, только подтвержденные как чистые для анализа, а вода соответствует требованиям воды 3 категории стандарта GB/T 6682.

6.1 Органолептическая проверка

Возьмите необходимое количество образца и поместите его на чистый белый лист бумаги, наблюдайте за его формой, цветом и наличием/отсутствием примесей при естественном освещении, понюхайте его запах.

6.2 Дифференцирование штамма

Выполняется в соответствии с Приложением A, метод пластинчатых разводок выступает в качестве арбитражного способа.

6.3 Количество живых клеток дрожжей

Выполняется в соответствии с Приложением B.

6.4 Влажность

Выполняется в соответствии со стандартом GB/T 6435.

6.5 Общий мышьяк

Выполняется в соответствии со стандартом GB/T 13079.

6.6 Свинец

Выполняется в соответствии с атомной абсорбционной спектрометрией графитовой печи, указанной в стандарте GB/T 13080.

6.7 Ртуть

Выполняется в соответствии со стандартом GB/T 13081.

6.8 Кадмий

Выполняется в соответствии со стандартом GB/T 13082.

6.9 Сальмонеллы

Выполняется в соответствии со стандартом GB/T 13091.

7. Правила проверки

7.1 Формирование партий

Продукция с одинаковой спецификацией, произведенная из одинакового материала в рамках одной технологии производства посредством непрерывного производства или одной и той же смены, является партией, но каждая партия продукции не должна превышать 50 тонн.

7.2 Выходной заводской контроль

Внешний вид и характеристики, количество живых клеток дрожжей, влажность являются пунктами выходного заводского контроля.

7.3 Типовые испытания

Пунктами типовых испытаний являются все пункты, указанные в главе 4 настоящего документа. При нормальных производственных условиях типовые испытания проводятся как минимум 1 раз в год. Типовые испытания также необходимо проводить в одной из следующих ситуаций:

a) при утверждении типа продукта и запуске его в производство;

b) в случае возникновения больших изменений в технологии производства, комплектовании или источниках основного сырьевого материала, которые могут повлиять на качество продукта;

c) когда производство остановлено более чем на 3 месяца и затем снова возобновлено;

d) при наличии большого различия между результатом выходного заводского контроля и результатами предыдущих типовых испытаний;

e) когда органы административного управления в области кормов представляют требования по проверке.

7.4 Правило принятия решения

7.4.1 Все проверенные пункты полностью отвечают требованиям, установлено, что данная партия продукции отвечает требованиям.

7.4.2 Если в результате проверки имеется какой-либо показатель, который не соответствует требованиям настоящего документа, можно взять двойной образец из той же партии продукции для повторной проверки. Даже если в результате повторной проверки один из показателей не соответствует требованиям настоящего документа, данная партия продукции будет признана не удовлетворяющей требованиям. Показатели сальмонеллы повторной проверке не подлежат.

7.4.3 Определение предельного значения каждого показателя пунктов должно осуществляться в соответствии со сравнительным методом полных (всех) значений стандарта GB/T 8170.

8. Этикетка, упаковка, транспортировка и хранение

8.1 Этикетка

Этикетка должна соответствовать требованиям стандарта GB 10648.

8.2 Упаковка

Упаковочные материалы должны быть чистыми и гигиеничными, предотвращать загрязнение, отсыревание и утечку.

8.3 Транспортировка

Транспортные средства должны быть чистыми и гигиеничными, защищенными от воздействия солнечных лучей и дождя, не должны смешиваться с токсичными и вредными товарами при транспортировке.

8.4 Хранение

Хранить при комнатной температуре, склад должен быть проветриваемым, сухим, защищенным от воздействия солнца и дождя, оборудован средствами защиты от насекомых и грызунов, не должны смешиваться с токсичными и вредными веществами при хранении.

Приложение А
(Нормативно-правовое)
Способы дифференцирования штаммов пекарских дрожжей

А.1 Дифференцирование формы

А.1.1 Питательная среда

А.1.1.1 Жидкая питательная среда для сусла: разбавить сусло водой до 10 °Bx ~ 15 °Bx (ареометр Баллинга), стерилизация паром высокого давления 115 °C 15 минут.

А.1.1.2 Агаровая среда для сусла: разбавить сусло водой до 10 °Bx ~ 15 °Bx (ареометр Баллинга), добавить 2%-ый порошкообразный агар, стерилизация паром высокого давления 115 °C в течение 15 минут.

А.1.1.3 Питательная среда для образования спор: виноградный сахар 0,1 %, хлорид калия 0,18 %, дрожжевая жидкость 0,25 %, ацетат натрия 0,82 %, агар 2 % смешать дистиллированной водой, стерилизация паром высокого давления 115 °C в течение 15 минут, установить трубку, оставить на наклонной плоскости.

А.1.1.4 Питательная среда для картофельного декстрозного агара: 200 г очищенного картофеля, 20 г глюкозы, 20 г агара, 1 л водопроводной воды. Картофель вымыть и очистить от кожуры, нарезать небольшими кусочками и сразу же положить в воду, чтобы избежать окисления. Прокипятить 30 минут, профильтровать через марлю, в фильтрат добавить воду до 1 л, добавить глюкозу и агар, растворить и разделить по колбам Эрленмейера или пробиркам, стерилизация паром высокого давления 115 °C в течение 20 минут.

А.1.2 Рост в жидкой сусловой питательной среде

После 3-дневного выращивания в спокойном состоянии при температуре 28 °C мицелии плотно оседают на дно в жидкой питательной среде, питательный раствор чистый, пленка не образуется. Возьмите небольшое количество мицелий и понаблюдайте под микроскопом 400 крат, клетки будут иметь овально-округлую или круглую форму, единичные или парные, иногда в виде сформированных сгустков, происходит почкование клеток. Отношение длины ячейки к ширине составляет 1 ~ 2, размер клетки делится на три типа: большие, средние и маленькие, размер больших клеток составляет (4.5 μm ~ 10 μm) x (7.0 μm ~ 21 μm), размер средних клеток составляет (3.5 μm ~ 8 μm) x (5.0 μm ~ 17.5 μm), размер маленьких клеток составляет (2.5 μm ~ 7 μm) x (4.5 μm ~ 11 μm).

А.1.3 Рост в среде суслового агара

После взращивания при температуре 28 °C в течение 3 дней колонии бактерий большие и влажные, слегка приподнятые или ровные, молочно-белые, гладкие, без морщин, с симметричными краями.

А.1.4 Рост в картофельном декстрозном агаре

После взращивания при температуре 28 °C в течение 3 дней рост осуществляется в картофельной агаровой среде, без псевдомицелий или с наличием сравнительно развитых, но не типичных псевдомицелий.

A.1.5 Рост в питательной споровой среде

После взращивания при температуре 28 °C в течение 3 дней могут образовываться аскоспоры, в каждой капсуле по 1 ~ 4 круглых гладких аскопор.

A.2 Физиолого-биохимические свойства

Выращивание осуществляется на сусловом скошенном агаре при температуре 28 °C ± 1 °C в течение 24 ~ 48 часов; испытания проводятся согласно таблице A.1, чтобы проверить физиолого-биохимические свойства пекарских дрожжей.

A.3 Оценка молекулярной биологии

Осуществление анализа сохранности последовательности ITS в зоне транскрибирования и в зоне 26S rDNA D1/D2 в генах rRNA бактериальных штаммов посредством метода анализа последовательности нуклеиновых кислот. Увеличение зоны 26S rDNA D1/D2 и последовательности ITS; осуществляется гомологическое сравнение с последовательностью Saccharomyces cerevisiae, имеющейся в международной базе данных последовательности нуклеиновой кислоты GenBank и др.; разница последовательностей менее 1 %, данный бактериальный штамм представляет собой пекарские дрожжи Saccharomyces cerevisiae.

Таблица A.1 Физиолого-биохимические свойства

Предмет испытаний		Результаты	Предмет испытаний		Результаты
Брожение углеводов	Глюкоза	+	Использование источника углерода	Мелибиоза	+, -
	Галактоза	+, -		Рафиноза	+, -
	Мальтоза	+, -		Целлобиоза	-
	Тростниковый сахар	+, -		Трегалоза	+, -
	Мелибиоза	+, -		Кислоза	-
	Рафиноза	+, -		Сорбоза	-
	Лактоза	-		Этанол	+, -
	Трегалоза	+, -		Глицерин	+, -
	Целлобиоза	-		Сорбоза	-
	Мелицитоза	+, -		Эритрит	-
Использование источника углерода	Лактоза	-		Маннит	-
	Галактоза	+, -		Инозит	-
	Мальтоза	+, -		Арбутин	-
	Тростниковый сахар	+, -	Использование источника азота	Азотнокислотный калий	-
Примечание: + означает положительную реакцию, - означает отрицательную реакцию.					

Приложение B
(Нормативно-правовое)
Методы определения живых клеток дрожжей

B.1 Первый способ – метод пластинчатых разводок (арбитражный метод)

Проверка осуществляется согласно первому методу стандарта GB 4789.15–2016. При проверке температура «добавления 225 мл стерильного разбавленного раствора», упомянутая в п.5.1.1 стандарта GB 4789.15-2016, составляет 37 °C ~ 40 °C.

B.2 Второй способ – окрашивание

B.2.1 Основные положения

Живые дрожжи могут восстанавливать и обесцвечивать метиленовый синий красильный раствор, попадающий в клетку, не окрашиваясь, в то время как мертвые дрожжи окрашиваются в синий цвет, количество живых клеток можно подсчитать, наблюдая в микроскоп.

B.2.2 Реактивы или материалы

B.2.2.1 Стерильный физиологический раствор: раствор хлористого натрия 0.85 %.

B.2.2.2 Метиленовый синий красильный раствор: смешать и растворить в стерильном физиологическом растворе метиленовый синий – 0.025 г, хлористый калий – 0.042 г, хлорид кальция гексагидрат – 0.048 г, гидрокарбонат натрия – 0.02 г, глюкозу – 1 г, разбавить до 100 мл, плотно закрыть и хранить при комнатной температуре.

B.2.3 Лабораторное оборудование

B.2.3.1 Микроскоп: кратность увеличения более 400.

B.2.3.2 Пластинка счетчика форменных элементов крови.

B.2.3.3 Специальное покровное стекло для счетчика форменных элементов крови.

B.2.3.4 Аналитические весы: точность – 0.1 мг.

B.2.3.5 Термостатическая водяная баня: точность контроля температуры ± 0.5 °C.

B.2.4 Этапы испытаний

B.2.4.1 Взвесьте 0.1 г образца с точностью до 0,0002 г, аккуратно добавьте 20 мл стерильного физиологического раствора температурой 37 °C ~ 40 °C, встряхните, чтобы он полностью диспергировался, активируйте его в термостатической водяной бане 32 °C в течение 1 часа.

B.2.4.2 Равномерно встряхните активирующий раствор, возьмите 0,1 мл активированной дрожжевой жидкости и поместите в пробирку, добавьте 0,9 мл метиленового синего красильного раствора, равномерно взболтайте, дайте спокойно постоять 10 минут при комнатной температуре для окрашивания.

B.2.4.3 Поставьте покровное стекло на счетную камеру пластинки счетчика форменных элементов крови, чтобы оно плотно накрывало пластинку счетчика форменных элементов крови. Возьмите 0.02 мл окрашенного бактериального раствора (B.2.4.2) и поднесите к месту соединения счетчика форменных элементов крови и покровного стекла, дайте бактериальному раствору автоматически всосаться в счетную камеру. В бактериальном

растворе не должно быть воздушных пузырей, оставьте в спокойном положении на 1 минуту, после чего наблюдайте и считайте с помощью микроскопа.

Примечание 1: счетные пластинки обычно имеют две спецификации: одна представляет собой 1 большую ячейку с 16 средними ячейками, а 1 средняя ячейка разделена на 25 маленьких ячеек, то есть спецификация 16x25; используйте счетную пластинку этой спецификации, для подсчета возьмите четыре средние ячейки (то есть 100 маленьких ячеек): верхняя левая, нижняя левая, верхняя правая, нижняя правая. Другая представляет собой 1 большую ячейку, разделенную на 25 средних ячеек, 1 средняя ячейка разделена на 16 маленьких ячеек, то есть спецификация 25X16; используйте счетную пластинку этой спецификации, для подсчета еще необходимо добавить 1 центральную среднюю ячейку (80 маленьких ячеек) кроме четырех средник ячеек: верхняя левая, нижняя левая, верхняя правая, нижняя правая.

Примечание 2: после установки покровного стекла не допускайте его сдвигов, в противном случае клетки тоже смогут перемещаться, после инстилляции при подсчете оно должно быть в горизонтальном положении.

B.2.4.4 После обнаружения сетки (клетки) с помощью объектива 10X и окуляра 16X поменяйте на объектив 40X, выполните точную регулировку до тех пор, пока поле обзора не станет наиболее четким, начните подсчет, когда клетка находится на линии сетки, используется принцип подсчета: считайте верхнюю, но не нижнюю, считайте левую, но не правую. Во время прорастания те, у которых количество превышает половины метроцитов, считаются как клетки, те, у которых меньше половины, не учитываются. Окрашенные в синий цвет – мертвые клетки, неокрашенные – живые клетки, подсчитываются только живые клетки.

Примечание 1: наблюдайте под микроскопом, форма клеток пекарских дрожжей овально-круглая или эллиптическая, размер (5 μm ~ 7.5 μm) x (7.5 μm ~ 10 μm), внутри клетки можно увидеть четкое ядро клетки.

Примечание 2: подсчитайте каждый образец дважды и возьмите их среднее арифметическое.

B.2.5 Расчет результата

Количество живых клеток в каждом испытательном образце – X_1, расчет количества, значение выражается в шутка/грамм, расчет осуществляется по формуле (B1):

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

Обозначения в формуле:

X_1 – количество живых клеток в каждом испытательном образце, единица измерения – штука на грамм (штука/г);

A – количество живых клеток в подсчитываемой маленькой ячейке, единица измерения – штука;

m – объем взятого в качестве пробы образца, единица измерения – грамм (г);

N – количество подсчитанных маленьких ячеек, единица измерения – штука.

В качестве результата измерения принимают среднее арифметическое результатов параллельного измерения.

B.2.6 Точность

В условиях воспроизводимости абсолютная разница между двумя полученными независимыми результатами испытаний составляет не более 10 % от среднего арифметического.