

T/TMAC

团 体 标 准

T/TMAC XXXX—XXXX

丁酸梭菌制剂发酵技术规程

Butyricus clostridium preparation fermentation technical specification

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

已授权的专利证明材料为专利证书复印件或扉页，已公开但尚未授权的专利申请证明材料为专利公开通知书复印件或扉页，未公开的专利申请的证明材料为专利申请号和申请日期。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中国技术市场协会 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 原辅料要求 1

 4.1 菌种要求 1

 4.2 发酵原料 2

 4.3 载体 2

 4.4 生产用水 2

5 发酵工艺 2

 5.1 工艺流程 2

 5.2 菌种活化 2

 5.3 一级种子培养 2

 5.4 二级种子培养 3

 5.5 发酵罐培养 3

 5.6 浓缩 3

 5.7 载体吸附 4

6 质量评估 4

 6.1 感官指标 4

 6.2 卫生指标 4

 6.3 技术指标 4

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。

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××××提出。

本文件由中国技术市场协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

丁酸梭菌制剂发酵技术规程

1 范围

本文件规定了丁酸梭菌制剂发酵的原辅料要求、发酵工艺、质量评估。

本文件适用于以丁酸梭菌为菌种，经液体发酵、浓缩、载体吸附工艺制得的丁酸梭菌制剂。

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/T 191 包装储运图形符号标志

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 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 饲料中沙门氏菌的检测方法

GB/T 13092 饲料中霉菌总数的测定

GB/T 19540 饲料中玉米赤霉烯酮的测定

GB/T 23181 微生物饲料添加剂通用要求

GB/T 30956 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

丁酸梭菌活菌数 live count of clostridium butyricum

单位质量或体积的丁酸梭菌产品中，在规定的培养条件下形成菌落的活菌数量，以CFU/g(或CFU/mL)表示。

4 原辅料要求

4.1 菌种要求

4.1.1 菌种来源

丁酸梭菌菌种应来源于国家认可的菌种保藏中心或经鉴定合格的保藏菌种，或经第三方认证的遗传稳定性验证的自筛菌株。

4.1.2 菌种鉴定

菌种鉴定应采用下列方法确认：

a) 形态学特征：革兰氏染色阳性，芽孢染色可见绿色芽孢，菌体呈梭形或网球拍状。

- b) 生理生化特征：葡萄糖产酸阳性、淀粉水解阳性、明胶液化阴性、触酶试验阴性、硝酸盐还原阳性。
- c) 分子生物学鉴定：16S rRNA 基因序列分析，与模式菌株 (*Clostridium butyricum* ATCC 19398) 序列相似性不应低于 99.0%。

4.1.3 菌种保存

菌种应以冻干粉或甘油管形式于-20 ℃下保存。生产用菌种传代不应超过5代，每3代应从原始保藏菌种重新活化。

4.2 发酵原料

4.2.1 碳源

碳源可使用葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖等。

4.2.2 氮源

氮源可使用酵母浸粉、蛋白胨、大豆蛋白胨、鱼粉、豆粕水解物等。

4.2.3 无机盐

无机盐可使用磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸锰、氯化钙、乙酸钠等。

4.2.4 其他辅料

其他辅料包括L-半胱氨酸盐酸盐、消泡剂等。

4.3 载体

载体应干燥、无霉变、无污染，粒度均匀。常用的载体可包括麸皮、玉米粉、稻壳粉、碳酸钙、脱脂米糠等。载体应符合GB/T 23181的规定。

4.4 生产用水

生产用水应符合GB/T 6682中三级及以上规格的规定。

5 发酵工艺

5.1 工艺流程

丁酸梭菌发酵工艺流程应包括菌种活化→一级种子培养→二级种子培养→发酵罐培养→浓缩→载体吸附。

5.2 菌种活化

菌种活化时，应将甘油管或冻干粉中的丁酸梭菌接种至RCM固体培养基或亚硫酸铁琼脂培养基，在80%N₂、10%CO₂、10%H₂的厌氧条件下，（36±1）℃温度中培养24 h~48 h，挑取圆形、中心黑色实心或灰白色半透明的典型单菌落，接入液体培养基进行活化。

5.3 一级种子培养

一级种子培养时，应将活化后的丁酸梭菌接种至种子培养基，接种量1%~3%，在（36±1）℃条件下厌氧静置培养12 h~24 h。种子培养基配方见表1。

表 1 种子培养基配方

序号	成分	含量/(g/L)
1	酵母浸粉	8.0~12.0
2	蛋白胨	5.0~10.0
3	葡萄糖	5.0~10.0
4	可溶性淀粉	1.0~3.0

序号	成分	含量/(g/L)
5	氯化钠	3.0~5.0
6	L-半胱氨酸盐酸盐	0.3~0.5
7	pH值	6.8±0.2

5.4 二级种子培养

二级种子培养时，应将一级种子液以1%~5%的接种量接入二级种子培养基，在 (36 ± 1) ℃条件下厌氧培养10 h~20 h。当镜检菌体形态均一、无杂菌污染时，可作为发酵罐接种用种子液。种子液活菌数不应小于 1.0×10^8 CFU/mL。

5.5 发酵罐培养

5.5.1 发酵培养基

发酵培养基配方见表2。

表2 发酵培养基配方

序号	成分	含量/(g/L)
1	葡萄糖	6.0~30.0
2	可溶性淀粉	0.5~10.0
3	酵母浸粉	5.0~30.0
4	蛋白胨（或鱼粉/豆粕水解物）	5.0~30.0
5	磷酸氢二钾	1.0~5.0
6	硫酸镁（ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）	0.2~1.2
7	硫酸锰（ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）	0.01~0.20
8	氯化钙	0.5~2.0
9	乙酸钠	3.0~4.0
10	L-半胱氨酸盐酸盐	0.3~0.5
11	pH值	6.8~7.2

5.5.2 发酵工艺参数

发酵培养应在密闭的发酵罐中进行，工艺参数控制应符合下列规定：

- 温度： (36 ± 1) ℃，产孢后期可调整为 $35\text{℃}\sim 37\text{℃}$ ；
- 搅拌速度： $(50\sim 200)$ r/min；
- 罐压：0.01 MPa~0.03 MPa；
- pH值控制：采用分阶段调控策略。
 - 第一阶段：初始pH值7.0，自然下降至5.5，不进行调控；
 - 第二阶段：当pH降至5.5时，通过流加10%~20%氨水或2 mol/L NaOH溶液维持pH值 5.5 ± 0.1 ；
 - 第三阶段：培养10 h~14 h，待菌体进入稳定期后，上调pH至6.0~6.5并维持至发酵结束；
- 氧化还原电位（ORP）：相对于Ag/AgCl电极，应低于-300 mV，必要时向罐内通入高纯氮气以维持厌氧环境；
- 发酵周期：发酵24 h~48 h，以芽孢形成率不小于85%为发酵终点判定依据。

5.5.3 补料策略

补料分批培养工艺可根据需要采用。当发酵液中残糖浓度降至2 g/L~3 g/L时，应补加50%葡萄糖溶液，维持残糖水平。补料总量不应超过初始培养基体积的5%~10%。

5.6 浓缩

发酵结束后，可采用管式离心机、碟式离心机或膜过滤设备对发酵液进行浓缩处理。浓缩倍数宜为5~10倍，浓缩后的菌泥活菌数不应小于 1.0×10^{10} CFU/g。

5.7 载体吸附

将浓缩后的菌泥与载体混合均匀，载体添加量以最终产品活菌数达到技术要求为准。

6 质量评估

6.1 感官指标

感官指标应符合表3的规定。

表 3 感官指标

序号	项目	要求	试验方法
1	色泽	浅灰白色至浅褐色，色泽均匀	取适量样品置于洁净白瓷盘中，在自然光下观察色泽、性状和杂质，嗅闻气味
2	气味	轻微酸味，无异味	
3	性状	流动性良好的粉末或颗粒，无结块	
4	杂质	无肉眼可见外来杂质	

6.2 卫生指标

卫生指标应符合表4的规定。

表 4 卫生指标

序号	项目	指标	试验方法
1	总砷（以As计）/（mg/kg）	≤ 2.0	GB/T 13079
2	铅（以Pb计）/（mg/kg）	≤ 10.0	GB/T 13080
3	汞（以Hg计）/（mg/kg）	≤ 0.1	GB/T 13081
4	镉（以Cd计）/（mg/kg）	≤ 2.0	GB/T 13082
5	黄曲霉毒素B ₁ /（ μ g/kg）	≤ 30.0	GB/T 30957
6	玉米赤霉烯酮/（mg/kg）	≤ 1.0	GB/T 19540
7	脱氧雪腐镰刀菌烯醇/（mg/kg）	≤ 5.0	GB/T 30956
8	霉菌总数/（CFU/g）	$\leq 4.0 \times 10^4$	GB/T 13092
9	大肠菌群/（MPN/100 g）	$\leq 1.0 \times 10^4$	GB/T 18869
10	沙门氏菌（25 g样品中）	不得检出	GB/T 13091

注：黄曲霉毒素B₁、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇仅适用于使用植物性载体的产品。

6.3 技术指标

6.3.1 丁酸梭菌活菌数

6.3.1.1 指标

保质期内活菌数不应小于 1.0×10^8 CFU/g。

6.3.1.2 测定

6.3.1.2.1 培养基

亚硫酸铁琼脂培养基（SPS琼脂）配方应为胰蛋白胨15.0 g/L、大豆蛋白胨5.0 g/L、酵母浸膏5.0 g/L、偏重亚硫酸钠1.0 g/L、柠檬酸铁铵1.0 g/L、琼脂20.0 g/L，pH 7.6±0.1，121 °C灭菌15 min。

6.3.1.2.2 操作步骤

操作应按下列步骤执行：

- a) 称取试样 10.00 g；

- b) 向锥形瓶中加入 90 mL 无菌稀释液，即 0.05% L-半胱氨酸盐酸盐生理盐水；
- c) 振荡 10 min 或拍击均质 1 min~2 min；
- d) 进行 10 倍梯度稀释，选取 3 个适宜稀释度，各取 1 mL 注入无菌平皿，倾注 15 mL~20 mL 冷却至温度为（45±1）℃的 SPS 琼脂培养基，混匀；
- e) 凝固后，置于厌氧罐或厌氧培养箱中，（36±1）℃条件下培养 48 h±2 h；
- f) 计数黑色菌落。

6.3.1.2.3 结果计算

结果应按下式计算：

$$X = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2) \times d} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：
X——试样中丁酸梭菌活菌数，单位为CFU/g；
ΣC——计数平板上典型菌落总数；
n₁——第一稀释度平皿数；
n₂——第二稀释度平皿数；
d——第一稀释度稀释因子；
f——稀释倍数。

6.3.2 水分

水分含量不应大于10%，按GB/T 6435的规定测试。

6.3.3 芽孢形成率

6.3.3.1 指标

芽孢形成率不应小于85%。

6.3.3.2 测定

取发酵液或样品稀释液，80℃水浴加热10 min后，按7.3.1方法测定芽孢数。同时按同样方法测定未经热处理的活菌总数。芽孢形成率按下式计算：

$$\text{芽孢形成率} = \frac{\text{芽孢数}}{\text{活菌总数}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$