###

发布

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

生物产品降解霉菌毒素功效评价技术规范

**Technical specifications for efficacy evaluation of mycotoxin degradation by biological product**

（征求意见稿）



发布

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局

中国国家标准化管理委员会

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

生物产品降解霉菌毒素功效评价技术规范

1 范围

本标准规定了生物产品降解霉菌毒素的功效评价原理、试剂与材料、仪器设备与器具、分析步骤和结果分析。

本标准适用于微生物和酶生物产品降解霉菌毒素的效果评价。

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，仅所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 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 17480-2008 饲料中黄曲霉毒素B1的测定 酶联免疫吸附法

GB 5009.209-2016 食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件：

3.1

降解率 degradation rate

降解实验前后，样品中霉菌毒素含量差与样品中初始浓度的比值，用百分数表示。

4 原理

具有霉菌毒素降解功效的生物产品，与加入的霉菌毒素进行混合培养后，体系中游离的霉菌毒素含量发生变化，通过测定培养周期内培养液中霉菌毒素的减少量，计算霉菌毒素的降解率，从而评价生物产品对霉菌毒素的降解功效。

5 试剂和材料

除特殊说明外，本标准所用试剂均为分析纯，水均为符合 GB/T 6682中规定的二级水。

5.1 1 mg/mL黄曲霉毒素B1标准品溶液

准确称取5 mg黄曲霉毒素B1标准品，用5 mL甲醇（5.1）溶解，临用前现配。

5.2 1 mg/mL脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品溶液

准确称取5 mg脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品，用5 mL甲醇（5.1）溶解，临用前现配。

5.3 1 mg/mL玉米赤霉烯酮标准品溶液

准确称取5 mg玉米赤霉烯酮标准品，用5 mL甲醇（5.1）溶解，临用前现配。

5.4 霉菌毒素试验溶液配制

将霉菌毒素标准品溶液，用甲醇10倍梯度稀释，配制成终浓度为10 μg/ml的试验溶液，备用。

5.5 基础营养基溶液

准确称量20 g葡萄糖，15 g蛋白胨，5 g氯化钠，0.5 g牛肉膏，纯水定容至1 L，pH 7.1。基础营养基溶液121 ºC，30 min灭菌后待用。

5.6 0.01M磷酸盐缓冲液，pH 7.4

准确称量9 g NaCl, 0.296 g NaH2PO4, 2.9 g Na2HPO4·12H2O溶于纯水中，用纯水定容至1 L。

5.7 酶联免疫吸附试剂盒

黄曲霉毒素B1酶联免疫吸附试剂盒，试剂盒灵敏度为0.03 ng/ml；脱氧雪腐镰刀菌烯醇酶联免疫吸附试剂盒，试剂盒灵敏度为4 ng/ml；玉米赤霉烯酮酶联免疫吸附试剂盒，试剂盒灵敏度为0.2 ng/ml。

6 仪器和设备

6.1 电子分析天平：精度为0.1 mg。

6.2 移液枪：规格20 μL，200 μL，1000 μL，5000 μL。

6.3 恒温水浴锅:温度控制范围在30 ℃-60 ℃之间，精度为0.1 ℃。

6.4 全自动酶标仪: 带450 nm 滤光片。

6.5 离心机：相对离心力≥4000 g。

6.6 生化培养箱：温度控制范围在5 ℃-45 ℃之间，精度为0.1 ℃。

6.7 压力蒸汽灭菌锅：额定温度126 ℃，额定压力0.14 MPa。

7 试验步骤

7.1 试验设计

不同类型生物产品降解霉菌毒素功效试验设计应符合表1要求

表1 生物产品降解霉菌毒素功效试验设计

|  |  |
| --- | --- |
| 项目 | 产品种类 |
| 微生物产品 | 酶产品 |
| 处理设计 | 1.供试样品2.失活样品3.空白对照 |
| 重复次数 | 不少于3次 |

7.2 供试样本处理

7.2.1 供试微生物样本处理

将供试微生物接种到含有200 mL基础营养基溶液（5.4）三角瓶中，生化培养箱120 rpm/min条件下37 ℃振荡培养36 h，即得供试微生物液体样本。

7.2.2 供试酶制剂样本处理

准确称取1 g酶制剂，用50 mL 0.01M pH 7.4磷酸盐缓冲液(5.5)溶解，即得供试酶制剂液体样本。

7.3 失活样品处理

取一半处理好的供试样品进行121 ºC，30 min杀菌处理，即得失活样本。

7.4 降解处理试验

7.4.1 微生物降解处理

分别取18 mL基础营养基溶液（5.4），供试样品和失活样品菌液上清加入降解瓶中。再分别加入需降解的霉菌毒素试验溶液（5.3）2 mL，32℃，120 rpm/min条件下振荡培养48 h，分别取100 μL降解液待测。

7.4.2 酶制剂降解处理

分别取18 mL磷酸盐缓冲液（5.5），供试样品和失活样品加入降解瓶中。再分别加入需降解的霉菌毒素试验溶液（5.3）2 mL37℃孵育48 h，48 h时后，分别取100 μL降解液待测。

7.5 反应液中霉菌毒素含量测定

将空白样品、失活样品和供试样品待测液按照GB 5009.209-2016和GB/T 17480-2008中的方法或用市售霉菌毒素ELISA试剂盒进行检测。

8 结果计算

8.1 降解率

按照式（1）计算：

$r=\frac{\left(C-C\_{e}\right)-(C-C\_{0})}{C}×100\%$.................................................................(1)

式中：

*R*——降解率（%）；

***C*——**空白样品中霉菌毒素浓度（μg/mL）；

*C0*——失活样品降解反应终点霉菌毒素浓度（μg/mL）；

*Ce*——供试样品降解反应终点霉菌毒素浓度（μg/mL）。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

10 废物处理

实验操作过程中产生的废液及分析后的高纯度样品，应委托有资质的的单位妥善处理。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_