ICS 65.120
CCS B46

团　体　标　准

T/SXSL　XXXX—2021

反刍动物用多菌种好氧发酵饲料

Multi-microbes aerobic fermented feed in ruminant

（征求意见稿）

2021- XX - XX 发布　　2021- XX - XX 实施

陕西省饲料协会 发布

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。

本文件由陕西杨凌富仕特生物科技有限公司主持，西北农林科技大学、青岛根源生物技术集团有限公司、陕西华秦农牧科技有限公司、陕西正能农牧科技有限公司、陕西康达尔农牧科技有限公司、西安草滩牧业有限公司、陕西上河实业集团有限责任公司、延安黑萨羊业科技（集团）有限公司、陕西秦川牛业有限公司、陕西澳尼克奶山羊育种有限公司、宝鸡布尔肉羊开发有限公司、榆林市横山区狄青塬种羊场、宝鸡凯农现代牧业有限公司共同参与起草完成。

本文件主要起草人：陈玉林、张科、杨雨鑫、姚军虎、叶丙奎、王文博、王义辉、杨景、刘洋、党东河、屈雷、冯军情、昝武银、李延华、苏晓鹏、高文瑞、常宏哲、刘锦旺、李宇。

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这些专利的责任。

本文件由陕西省饲料协会提出并归口。

反刍动物用多菌种好氧发酵饲料

1 范围

本文件规定了反刍动物用多菌种好氧发酵饲料的术语和定义、原料要求、质量要求、采样、试验方法、检验规则、标签、包装、运输、储存和保质期。

本文件适用于以酵母菌和枯草芽孢杆菌为主的两种以上微生物为发酵菌种，以两种或两种以上饲料原料为发酵底物，经固态好氧发酵培养，获得的反刍动物用饲料产品。

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 5498 粮油检验 容重测定。

GB/T 5917.1 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法。

GB/T 6432 饲料中粗蛋白的含量测定 凯氏定氮法。

GB/T 6434 饲料中粗纤维的含量测定 过滤法。

GB/T 6435 饲料中水分的测定。

GB/T 6438 饲料中粗灰分的测定。

GB 10648 饲料标签。

GB 13078 饲料卫生标准。

GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定。

GB/T 13092 饲料中霉菌总数测定方法。

GB/T 14699.1 饲料 采样。

GB/T 17480 饲料中黄曲霉毒素 B1 的测定 酶联免疫吸附法。

GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差。

GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定。

GB/T 19540 饲料中玉米赤霉烯酮的测定。

GB/T 26428 饲用微生物制剂中枯草芽孢杆菌的检测。

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

GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数

SB/T 10317 蛋白酶活力测定法。

DB15/T 1458 青贮饲料 pH 值、有机酸、氨态氮测定方法。

附录 A 纤维素酶活力的测定 分光光度计法。

附录 B 甘露聚糖的测定。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

多菌种好氧发酵饲料 Multi-microbes aerobic fermented feed

即以国家相关法规允许使用的，以酵母菌和枯草芽孢杆菌为主的两种以上微生物为发

酵菌种，两种或两种以上饲料原料为发酵底物，经固态好氧发酵培养，得到的符合相关质量要求的饲料产品。

4 原料要求

生产产品所用原料和添加物应适合于反刍动物使用，并符合《饲料原料目录》和《饲料添加剂品种目录（2017）》的规定，严禁使用国家明令禁止的添加物和化学制品。生产所使用的菌种（株）应满足农业农村部印发的《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及安全性评估指南》中的要求。

5 质量要求

5.1 感官要求

感官性状描述见表 1。

表 1 感官指标

项目	要求
色泽	色泽均匀一致，具有发酵底物特有的色泽
气味	具有发酵的典型香味，无异味，无异嗅
杂质	无异物
状态	粉状或颗粒状，无发霉变质及结块

5.2 成品容重及粒度

容重要求 350～450g/L，应全部通过 3.2mm 分析筛。

5.3 技术指标

技术指标应符合表 2 要求。

表 2 技术指标

项目	指标要求（风干基础）
粗蛋白（%），≥	12.0
粗纤维（%），	8.0～20.0
粗灰分（%），≤	8.0
水分（%），≤	13.0
pH（10%水溶液）	4.5～6.0
蛋白酶活力（U/kg），≥	4000
纤维素酶活力（U/kg），≥	100
甘露聚糖（%），≥	1.0
酵母菌数（CFU/g），≥	1×10^7
枯草芽孢杆菌数（CFU/g），≥	1×10^7

5.4 卫生指标

卫生指标应符合表 3 的要求。表中未作说明的其他卫生指标应符合 GB 13078 的标准要求。

表 3 卫生指标

项目	限量
霉菌总数（CFU/g），≤	1×10^4
黄曲霉毒素（μg/kg），≤	30.0
脱氧雪腐镰刀菌烯醇(呕吐毒素)（mg/kg），≤	5.0
玉米赤霉烯酮（mg/kg），≤	1.0
沙门氏菌（25g）	不得检出
大肠菌群（CFU/g），≤	1×10^4

6 采样

按照 GB/T 14699.1 规定执行。

7 试验方法

7.1 感官指标

取适量样品于洁净白瓷盘内，在正常光照、通风良好、无异味的环境下，采用目测、鼻嗅的方法检验。

7.2 产品容重和粒度

7.2.1 容重

按照 GB/T 5498 规定执行。

7.2.2 粒度

按照 GB/T 5917.1 规定执行。

7.3 粗蛋白

按照 GB/T 6432 规定执行。

7.4 粗纤维

按照 GB/T 6434 规定执行。

7.5 水分

按照 GB/T 6435 规定执行。

7.6 粗灰分

按照 GB/T 6438 规定执行。

7.7 pH

按照 DB15/T 1458 规定执行。

7.8 蛋白酶活

按照 SB/T 10317-1999 规定执行。

7.7 纤维素酶活

按照附录 A 规定执行。

7.8 甘露聚糖

按照附录 B 规定执行。

7.9 酵母菌数

按照 GB 4789.15 规定执行。

7.10 枯草芽孢杆菌数

按照 GB/T 26428 规定执行。

7.11 黄曲霉毒素 B_1

按照 GB/T 17480 规定执行。

7.12 玉米赤霉烯酮

按照 GB/T 19540 规定执行。

7.13 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(呕吐毒素)

按照 GB/T 30956 规定执行。

7.14 大肠菌群

按照 GB/T 18869 规定执行。

7.15 霉菌总数

按照 GB/T 13092 规定执行。

6.20 沙门氏菌

按照 GB/T 13091 规定执行。

8 检验规则

8.1 组批

以相同菌株、相同的发酵工艺、相同生产条件、连续生产或同一班次生产的产品为一

批，但每批产品不得超过 30 吨。

8.2 检验

8.2.1 出厂检验

产品出厂检验由企业质检部门负责。检验项目为感官、水分、粗蛋白质、甘露聚糖。所有出厂产品均应符合本文件要求，每批产品出厂时应附有质量检验合格证（章）和使用说明。

8.2.2 定期检验

在出厂检验的基础上，每季度增加检测酵母菌数、蛋白酶活力、纤维素酶活力、pH、黄曲霉毒素 B_1、呕吐毒素及玉米赤霉烯酮。

8.2.3 型式检验

型式检验为产品的全部项目检验，每年不得少于一次。有下列情况之一时需进行型式检验：

a) 新产品投产时；
b) 当生产工艺和设备、配方及配料发生较大变化时；
c) 停产半年以上再恢复生产时；
d) 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时；
e） 国家质量监督机构提出进行型式检验要求时。

8.3 判定规则

8.3.1 检验结果全部符合本标准规定时，判该批产品为合格品。

8.3.2 当产品中的大肠杆菌、霉菌总数及沙门氏菌指标有一项不合格时，判定整批产品为不合格。

8.3.3 除致病菌以外的其他指标，如有一项不合格，应同一批次加倍抽取进行复检，以复检结果为准；型式检验不合格时，用留样样品进行复检；复检中仍有一项不合格，则判定该批产品不合格。

8.3.4 检测结果判定的允许误差按 GB/T 18823 规定执行。

9 标签、包装、运输、贮存、保质期

9.1 标签

应符合 GB 10648 的有关规定，并标明所用原料，标有生物发酵的标志。

9.2 包装

包装物应完整，无破损、无泄漏。包装材料采用无毒、无害，对产品质量无影响的包装材料。

9.3 运输

产品在运输过程中应防止包装破损、日晒、雨淋，不得与有毒有害物质混运。

9.4 贮存

产品应贮存通风、干燥、避光处，严禁与有毒有害物质混贮。

9.5 保质期

在包装完好和未经启封及规定的贮运条件下，一、四季度保质期不超过 6 个月，二、三季度保质期不超过 3 个月。

附 录 A

（规范性附录）

纤维素酶活力的测定 分光光度计法

A.1 原理

在规定的温度和 pH 条件下，纤维素酶能将羧甲基纤维素降解成寡糖和单糖。具有还原性的寡糖和单糖在沸水浴条件下与 3，5-二硝基水杨酸（DNS 试剂）发生显色反应。反应液颜色的深浅与酶解产生的还原糖量成正比，而还原糖的生成量又与反应液中纤维素酶的活力成正比。用分光光度计测定反应液的吸光度值，可计算出纤维素酶的活力。

A.2 仪器

A.2.1 紫外分光光度计，检测波长 540 nm。

A.2.2 天平：感量 0.001 g 和 0.0001 g。

A.2.3 冷冻离心机。

A.2.4 pH 计：精确至 0.01。

A.2.5 电热恒温干燥箱：（103±2）℃。

A.2.6 磁力搅拌器：附加热功能。

A.2.7 恒温水浴锅：精确至±0.1℃。

A.2.8 电磁炉。

A.3 试剂

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

A.3.1 柠檬酸溶液（0.1 mol/L，pH 5.5）：称取柠檬酸 2.10 g，加水稀释，定容至 100 mL，摇匀。

A.3.2 柠檬酸钠溶液（0.1 mol/L，pH 5.6）：称取柠檬酸钠 2.94 g，加水稀释，定容至 100 mL，摇匀。

A.3.3 柠檬酸盐缓冲液配制（0.05 mol/L, pH 5.5）：称取柠檬酸 10.5 g，加入氢氧化钠 5 g，再加入 800 mL 水溶解，用柠檬酸溶液（A.3.1）或柠檬酸钠溶液（A.3.2）调节 pH 至 5.5，加水稀释，定容至 1000 mL，摇匀。

A.3.4 羧甲基纤维素钠溶液（1%）：准确称取羧甲基纤维素钠 1.00 g（精确至 0.001 g），溶于 100 mL pH 为 5.5 的柠檬酸缓冲液中，磁力搅拌，同时缓慢加热，充分溶解后，0-4 ℃保存。

A.3.5 3，5-二硝基水杨酸（DNS）显色液：准确称取氢氧化钠 10 g、3,5-二硝基水杨酸 3.15

g，溶于适量的蒸馏水中，再称量酒石酸钾钠 91.0 g 溶于 150-250 mL 蒸馏水中，加热至充分溶解，将上述两溶液混合，最后加入亚硫酸钠 2.5 g 和重蒸酚 2.5 g，搅拌溶解，定容至 500 mL，倒入棕色瓶在冰箱中贮存至少一周后使用，使用前必须要用滤纸过滤。

A.3.6 葡萄糖标准溶液（10.0 mg/ml）：称取无水葡萄糖 1.00 g（精确至 0.001 g）,加水稀释，摇匀，0-4 ℃保存。

A.4 分析步骤

A.4.1 试样溶液制备

称取 0.2-4 g 试样（精确至 0.001g），加入 40 mL 柠檬酸盐缓冲液（A.3.3），磁力搅拌 30 min，再用柠檬酸盐缓冲液（A.3.3）定容至 100 mL，在 4℃条件下避光保存 24 h。摇匀，取 30mL-50mL，以 3000r/min 离心 3 min。用四层纱布过滤，滤液待用。取 5 mL 上清液，用柠檬酸盐缓冲液（A.3.3）做二次稀释（稀释后的待测酶液应控制在标准曲线测定的范围内）。

A.4.2 测定步骤

A.4.2.1 标准曲线绘制

从葡萄糖标准溶液（A.3.6）中依次吸 1，2，3，4，5，6 ml 各溶于 100 mL 容量瓶中，制成浓度 0.1，0.2，0.3，0.4，0.5，0.6 mg/mL 溶液，吸取 1.0mL 葡萄糖溶液加入 2mL DNS，煮沸 10 min，快速冷却，加水定容至 10 mL，摇匀。以试剂空白溶液为空白对照，于 540 nm 处测定吸光度值，绘制标准曲线。

A.4.2.2 试样溶液的测定

量取 1 mL 的羧甲基纤维素钠溶液（A.3.4）加入到 10 mL 的离心管中，50 ℃水浴锅中预热 10 min；加入 200 μL 的粗酶液（A.4.1），并迅速开始计时，继续在水浴锅中水浴 60 min；60 min 后迅速取出，加入 2 mL 的 DNS（A.3.5），然后沸水煮 10 min；迅速冷却，定容到 10 mL，摇匀；在 3.2×103 r/min 下离心 15 min 后，取上清液，用灭活的粗酶液做对照组，于 540 nm 处测定吸光度值。每个样品做 3 个重复。

A.4.3 试验数据处理

计算公式如下：

$$XD = [(AE-AB) \times K + C0] / (M \times t) \times 1000$$

$$X = XD \times Dt$$

式中：

XD：纤维素酶活力，单位为（U/mL）;

AE：酶反应液的吸光度；

AB：空白对照的吸光度；

K：标准曲线的斜率；

C0：标准曲线的截距；

M：葡萄糖的摩尔质量，即 M=180.2 g/mol；

T：酶与底物反应时间，单位为 min；

X：试样纤维素酶活力；

Dt：试样的总稀释倍数；

1000：转化因子，即 1 mmol=1000 μmol。

附 录 B

（规范性附录）

甘露聚糖的测定

A.1 原理

甘露聚糖在硫酸的作用下，先水解成单糖，并迅速脱水生成糖醛衍生物，然后与苯酚缩合成橙黄色化合物，在一定范围内其颜色深浅与糖的含量成正比，故可用比色法测定。

A.2 仪器

A.2.1 紫外分光光度计，检测波长 490 nm。

A.2.2 天平：感量 0.001 g 和 0.0001 g。

A.2.3 涡旋振荡仪。

A.2.4 电热恒温干燥箱：（103 ± 2）℃。

A.2.5 恒温水浴锅：精确至 ± 0.1 ℃。

A.3 试剂

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

A.3.1 浓硫酸。

A.3.2 氢氧化钠（0.6%）：称取 6.0 g NaOH，加适量水溶解后，转移至 1000 mL 容量瓶中定容至刻度，摇匀，存放在阴暗通风的地方。

A.3.3 5%苯酚溶液（5%）：称取重蒸馏苯酚 15.0 g，加适量水溶解后，转移至 250 mL 容量瓶中定容至刻度，摇匀后置于棕色试剂瓶。

A.3.4 甘露糖标准溶液（100 ug/mL）：准确称取经（103±2）℃干燥至恒重的 0.020g 甘露糖标准品，溶于水，定容至 200 mL，摇匀。

A.4 分析步骤

A.4.1 试样溶液制备

准确称取样品 0.200 g，用 0.6%氢氧化钠溶液溶解，并完全转移至 100 mL 容量瓶中定容，75 ℃水浴 30 min，取出立即冷却至室温，过滤，弃去初滤液，取 10 mL 滤液到 100 mL 容量瓶中定容。

A.4.2 测定步骤

A.4.2.1 标准曲线绘制

分别吸取 0.0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL 甘露糖标准溶液于 20.0 mL

具塞试管中，各以水补至 1.0 mL，加入 1.0 mL 6%苯酚溶液，混匀，然后快速加入 5.0 mL 浓硫酸，使用漩涡振荡器使反应液混匀，然后将试管置于沸水浴中水解 20 min，取出冷却至室温，在波长 490 nm 处测定吸光度值。以甘露糖含量为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

A.4.2.2 **试样溶液的测定**

取待测样品溶液 1.0 mL 于 20.0 mL 具塞试管中，加入 1.0 mL 6%苯酚溶液，混匀，然后快速加入 5.0 mL 浓硫酸，使用漩涡振荡器使反应液混匀，然后将试管置于沸水浴中水解 20 min，取出冷却至室温，在波长 490 nm 处测定吸光度值，根据标准曲线线性回归方程计算甘露聚糖含量。以等量的蒸馏水作空白，每个样品做 3 个重复。

A.4.3 **试验数据处理**

计算公式如下：

$$X = (C \times 10^{-3} \times 0.9 \times 100) / M$$

式中：

X：甘露聚糖含量（%）；

C：标准曲线计算出样品甘露糖含量（μg/mL）；

M：样品质量（g）；

0.9：甘露糖换算为甘露聚糖的系数。