ICS 65.120
CCS B46

DB63

青 海 省 地 方 标 准

DB 63/ TXXXX —2022

舍饲牦牛发酵精补料生产技术规范

（报批稿）

（本稿完成日期：2022 年 9 月 27）

2022－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

青海省市场监督管理局　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。

本文件由青海省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：青海省畜牧兽医科学院、西宁市动物疫病预防控制中心、湟中丰泰种养殖专业合作社、大通县桥头镇畜牧兽医站

本文件主要起草人：王磊、吴国芳、张剑搏、柴沙驼、王迅、项洋、马玉红、马遥、索宏德、张成图、赵武忠

本文件由青海省农业农村厅监督实施。

舍饲牦牛发酵精补料生产技术规范

1 范围

本文件规定了舍饲牦牛发酵精补料的术语和定义、原料要求、发酵剂、发酵流程、采样方法、发酵精补料质量控制、发酵精补料的使用、贮存等。

本文件适用于以鼠李糖乳杆菌（*Lactobacillus rhamnosus*）、乳酸片球菌（*Pediococcus acidilactici*）、干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）、酿酒酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*）、毕赤酵母菌（*Pichia pastoris*）为发酵菌种，以舍饲牦牛精补料为发酵底物，经固体发酵后生产的饲料产品。

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 5523 粮油检验 粮食、油料的脂肪酶活动度的测定
GB/T 5521 粮油检验 谷物及其制品中α-淀粉酶活性的测定 比色法
GB/T 6432 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法
GB/T 9724 化学试剂 pH值测定通则
GB 13078 饲料卫生标准
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 20194 动物饲料中淀粉含量的测定 旋光法
GB/T 20806 饲料中中性洗涤纤维（NDF）的测定
GB/T 28715 饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定 分光光度法
GB/T 34224 生物产品中功能性微生物检测
GB/T 37493 粮油检验 谷物、豆类中可溶性糖的测定 铜还原-碘量法
NY/T 912 饲料添加剂纤维素酶活力的测定 分光光度法
NY/T 1459 饲料中酸性洗涤纤维的测定
NY 5027 无公害食品 畜禽饮用水水质
T/NAIA 001 发酵饲料中氨态氮的测定 凯氏定氮法
T/CSWSL 002 发酵饲料技术通则
T/SDAA 0049 饲料中黄曲霉毒素 B1、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素快速测定 上转发光法
饲料原料目录（2013） （中华人民共和国农业部公告第 1773 号）
饲料添加剂品种目录（2013） （中华人民共和国农业部公告第 2045 号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

舍饲牦牛发酵精补料

以符合《饲料添加剂品种目录》要求的微生物为发酵菌种，以舍饲牦牛精补料为发酵底物，经固体发酵后生产的发酵精补料。

3.2

发酵设施（容器）

包括发酵袋（带排气阀）、发酵桶、发酵池、发酵罐等，使用前充分冲洗干净，并严格进行杀菌消毒、干燥处理。

3.3

发酵剂

发酵剂亦称发酵接种剂、饲料发酵剂等，含有一种或一种以上的益生菌。

4 精补料要求

4.1 原料选择要求

所用原料应符合《饲料原料目录》的规定，所用添加剂应符合《饲料添加剂品种目录》的规定。不得使用动物源性（乳制品除外）原料，不得使用国家明令禁止的添加物和化学制品。无腐败、发霉、变质情况，无有毒、有害杂物，所有原料粉碎后过40目筛。

4.2 精补料组成与营养水平

精补料要满足舍饲育肥牦牛（体重≥300 kg，日增重≥0.5 kg/d）营养需要量。以玉米、豆粕、麸皮、菜籽粕、预混料、食盐等为主要原料。营养水平：代谢能10.5 MJ/kg～12.5 MJ/kg、粗蛋白16%～18%、钙0.35%～0.55%、总磷0.175%～0.275%。

5 发酵菌种

5.1 种类

5.1.1 乳酸菌

鼠李糖乳杆菌（*Lactobacillus rhamnosus*）、乳酸片球菌（*Pediococcus acidilactici*）、干酪乳杆菌（*Lactobacillus casei*）。有效活菌数≥10^{11} CFU/ml。

5.1.2 酵母菌

酿酒酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*） 、毕赤酵母菌（*Pichia pastoris*）。有效活菌数≥10^{9} CFU/ml。

5.2 要求

符合《饲料添加剂品种目录要求》或经过主管部门新批准的允许使用的微生物菌种。

6 发酵流程

6.1 发酵方式

固态发酵，发酵总水分40%～60%。

6.2 发酵场地管理

定期消毒，保持干燥清洁，防止污染。

6.3 菌种活化与发酵剂制备

将食盐、尿素、红糖和水按1:1:100:1000比例加入干净容器中并煮沸，待水温降至25℃～30℃时，加入发酵菌种，乳酸菌37℃培养1～2天，酵母菌28℃培养2～3天，然后将酵母菌培养液和乳酸菌培养液按2:1比例混合，获得发酵剂。用水水质应符合NY 5027的要求。

6.4 发酵条件

按发酵剂接种量5%（mL:g）、水料比1:1（g:g）和精补料重量，分别计算出发酵剂用量和加水量。将发酵剂于水中混匀后，喷洒精补料，充分搅拌机混匀，装入发酵设备（容器），压实密封，20℃～30℃，发酵5～7天。

7 采样

发酵精补料发酵完成后，按GB/T 14699.1进行采样。

8 发酵精补料质量控制

8.1 发酵精补料感官指标

按照气味、质地、色泽进行评定，应符合表1的规定。

表1 发酵精补料感官品质评分标准

指标	评分标准	得分
气味	淡淡酸香味	10
	刺鼻酸味、无霉味	5
	刺鼻霉味、酸臭味	0
质地	松软、不结块、不粘手、无发霉	10
	成团、不粘手、轻微发霉	5
	严重发霉、结块、粘手	0
色泽	亮黄色	10
	淡黄色或黄白色	5
	褐色或黑褐色	0

8.2 发酵精补料营养指标要求

发酵精补料粗蛋白、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、氨态氮、淀粉、可溶性糖、pH等营养指标，应符合表2的规定。粗蛋白测定按GB/T 6432执行，中性洗涤纤维测定按GB/T 20806执行，酸性洗涤纤维测定按NY/T 1459执行，氨态氮测定按T/NAIA 001执行，淀粉测定按GB/T 20194执行，可溶性糖测定按GB/T 37493执行，pH值测定方按GB/T 9724执行，有效活菌数测定按GB/T 34224执行。

表2　发酵精补料营养指标

营养指标名称	指标
粗蛋白（%）	16～20
中性洗涤纤维（%）	35～45
酸性洗涤纤维（%）	20～30
氨态氮（mg/g）	＜5
可溶性糖（mg/g）	＞3
淀粉（mg/g）	≥50
pH	＜4.5
有效活菌总数（CFU/g）	≥10^8

8.3　发酵精补料酶活力指标要求

酸性蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶、α-淀粉酶、β-淀粉酶等酶活力指标，应符合表3的规定。纤维素酶活力测定按NY/T 912执行，酸性蛋白酶活力测定按GB/T 28715执行，α-淀粉酶活力测定按GB/T 5521执行，脂肪酶活力测定按GB/T 5523执行，β-淀粉酶活力测定按附录A执行。

表3　发酵精补料酶活性标准

酶名称	酶活力（U/g）
酸性蛋白酶	>190
纤维素酶	>11
脂肪酶	>15
α-淀粉酶	>65
β-淀粉酶	>57

8.4　发酵精补料卫生指标要求

玉米赤霉烯酮（ZEN）、黄曲霉毒素B1（AFB1）、呕吐毒素（DON）指标应符合表4，其它卫生指标应符合GB 13078限量标准。黄曲霉毒素B1（AFB1）测定按GB/T 17480执行，呕吐毒素（DON）测定按T/SDAA 0049执行，玉米赤霉烯酮毒素测定按T/SDAA 0049执行。

表4　霉菌毒素限量标准

毒素名称	含量水平（μg/kg）
玉米赤霉烯酮（ZEN）	<15
黄曲霉毒素 B1（AFB1）	<25
呕吐毒素（DON）	<400

9　发酵精补料标签、包装、贮存和运输

按T/CSWSL 002实施。

10 发酵精补料使用方法

发酵精补料可替代精补料的10%～30%（以干物质计算）或20%～60%（以湿鲜料计算），开喂后发酵精补料应在20天以内喂完。

附　录　A
（规范性附录）
β-淀粉酶活力的测定 DNS比色法

A.1　原理

淀粉酶主要包括α-淀粉酶和β-淀粉酶两种。α-淀粉酶可随机地作用于淀粉中的α-1,4-糖苷键，生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖，同时使淀粉的粘度降低，因此又称为液化酶。β-淀粉酶可从淀粉的非还原性末端进行水解，每次水解下一分子麦芽糖，又被称为糖化酶。淀粉酶催化产生的这些还原糖能使3,5-二硝基水杨酸还原，生成棕红色的3-氨基-5-硝基水杨酸。α-淀粉酶不耐酸，β-淀粉酶不耐热。根据上述特性，钝化其中之一，就可测出另一种淀粉酶的活力。

一个酶活力单位（U）定义为：在pH 6.0、40℃条件下，每小时分解1%的可溶性淀粉产生相当于1 mg麦芽糖所需的酶量。

A.2　仪器

可见分光光度计、恒温水浴锅、离心机、可调式移液器、玻璃比色皿和蒸馏水。

A.3　试剂

A.3.1　酶提取液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，含1%聚乙烯吡咯烷酮（PVP），5 mmol/L的2-巯基乙醇）：准确称取Tris-Base 6.055 g，加900 mL蒸馏水充分溶解后，加入10 g PVP，再加入纯度为99.0%的2-巯基乙醇353.89 μL，最后用盐酸调至pH 7.5，定容至1000 mL。

A.3.2　麦芽糖标准溶液（1 mg/mL）：精确称取100 mg麦芽糖溶于蒸馏水，定容至100 ml，即为1 mg/ml的标准溶液。

A.3.3　DNS 试剂：称取10.5 g固体NaOH颗粒分批次缓慢加入350 mL蒸馏水中待完全溶解后，再依次分别加入3.15 g的3,5-二硝基水杨酸，244.3 g酒石酸钾钠，搅拌均匀后，在通风橱中加入2.5 g苯酚，完全溶解后加入2.5 g无水Na_2SO_3，至溶液完全澄清透明后定容至500 mL，遮光密封保存一周后方可使用。

A.3.4　磷酸缓冲液（pH 6.0）：称取5.365 g的Na_2HPO_4•$12H_2O$溶于100 mL蒸馏水中作为A液，称取27.8 g的NaH_2PO_4•$2H_2O$溶于1000 mL蒸馏水中作为B液，最后取A液65 mL、B液935 mL混合均匀后，调节pH至6.0。

A.3.5　1%可溶性淀粉溶液：称取1 g可溶性淀粉，加入50 mL磷酸缓冲液，与沸水中搅拌至澄清透明，冷却至室温后，加蒸馏水定容至100 mL即可。

A.4　分析步骤

A.4.1　β-淀粉酶的提取

取发酵精补料2.0 g装入离心管中，按1:5（W/V）加入酶提取液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，含1% PVP，5 mmol/L的2-巯基乙醇），离心（12000 r/min，4℃）30 min，取上清液倒入25 mL容量瓶，定容至刻度，即为所提取的粗酶液。

A.4.2　标准曲线绘制

依次吸取0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL麦芽糖标准溶液至7支具塞试管，分别加入蒸馏水0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0 mL，再加入1.5 mL DNS，沸水浴加热 10 min，冷却至室温后加蒸馏水10.5 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.4.3 试样溶液测定

用3,5-二硝基水杨酸法（DNS法）测定β-淀粉酶酶活水平：取1 mL用磷酸缓冲液（pH 6.0）配制的1%可溶性淀粉溶液，于40℃预热 5 min，加1 mL的β-淀粉酶酶液，混合均匀，40℃保温30 min，迅速吸取0.5 ml反应液加入1.5 mL的DNS试剂，沸水浴加热10 min，冷却至室温后加蒸馏水10.5 mL，混合均匀后于540 nm波长下测OD值。

A.4.4 酶活力计算

酶活力U（/g）= ΔOD_{540}×K×N×2×20

式中：

ΔOD_{540}——540 nm波长下测定的OD值；

K——标准曲线常数；

N——酶液稀释倍数；

2——反应30 min换算成60 min；

20——将吸取0.5 mL反应液换算成10 mL。