ICS 65.120
CCS B 46

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB21/TXXXX—XXXX

大豆来源蛋白质饲料原料预消化酶解工艺技术规范

Technical specification for enzymatic hydrolysis of soybean protein feed

（报批稿）

XXXX-XX-XX 发布 XXXX-XX-XX 实施

辽宁省市场监督管理局 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。

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。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位:辽宁省农业发展服务中心、辽宁康普利德生物科技有限公司、沈阳市康普利德生物科技有限公司、 彰武县畜牧业发展服务中心。

本文件主要起草人: 韩业东、李延山、权志中、魏莱、董延江、杨宁、王虎、梁丽萍、吴倩、卞大伟、宣丽、肖爱波、张岩彬、刘志良、刘胜男、李春雨、佟玉红、章沙沙、吕凤禄、黄雪娇、赵红秋。

本文件发布实施后,任何单位和个人如有问题和意见建议,均可以通过来电和来函等方式进行反馈,我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址:辽宁省农业农村厅(沈阳市和平区太原北街 2 号),联系电话:024-23447862。

标准起草单位通讯地址：辽宁省农业发展服务中心（沈阳市和平区南四经街 143 号），联系电话：024-23264599。

大豆来源蛋白质饲料原料预消化酶解工艺技术规范

1 范围

本文件规定了大豆来源蛋白质饲料原料预消化酶解工艺的设备、原料、工艺以及质量等方面技术要求。

本文件适用于以大豆或大豆加工产品等蛋白质饲料为原料的预消化酶解工艺控制。

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 6432 饲料中粗蛋白的测定 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 6436 饲料中钙的测定
GB/T 6437 饲料中总磷的测定 分光光度法
GB/T 6438 饲料中粗灰分的测定
GB 13078 饲料卫生标准
GB/T 14699.1 饲料 采样
GB/T 22491 大豆低聚糖
GB/T 22492 大豆肽粉

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

饲料预消化技术 Feed pre-digestion technology

饲料预消化技术是模拟动物消化过程，对饲料原料进行加工处理，降解原料中的部分大分子营养物质，消除或降解大部分抗营养因子和有毒有害物质，增加可消化养分含量，提高饲料利用率的一种新型饲料加工技术。

4 设备要求

4.1 酶解反应釜

酶解反应釜应具有混合、加热、保温功能，且具备清洗和消毒条件。

4.2 干燥设备

干燥设备应根据原料、半成品特性和产品要求选择，包括喷雾干燥设备、流化床干燥设备、滚筒干燥设备等。

5 原料

5.1 预消化原料

预消化原料主要包括大豆、大豆分离蛋白、豆粕、豆饼、豆渣等。

5.2 酶制剂

酶制剂以蛋白酶为主，纤维素酶、植酸酶、果胶酶为辅进行选择。

6 酶解工艺要求

6.1 混合

将预消化原料、酶制剂和水进行混合，水分含量50%～60%，混合均匀度变异系数≤7%。

6.2 酶解

蛋白酶、纤维素酶、植酸酶酶解温度应控制在45℃～50℃之间，pH值控制在5.5～6.5，最宜酶解时间为4h～6h。

6.3 灭酶

酶解结束后，要对酶解物料进行灭酶处理，灭酶温度≥95℃，灭酶时间10min～15min。

6.4 干燥

依据不同的物料特性和产品用途采取适当的干燥设备及工艺参数，最终控制水分≤12%。

7 质量要求

7.1 感官指标要求及其检测方法

外观色泽均一，呈淡黄色、黄色至棕黄色，具有大豆特有气味，无异味，无杂质。采用目视、鼻嗅、手感的方法检查样品的色泽、气味、质地。取样应符合GB/T 14699.1的要求。

7.2 卫生指标要求及其检测方法

按GB 13078的规定执行。

7.3 营养指标要求及其检测方法

7.3.1 常规营养指标及其检测方法

常规营养指标包括粗蛋白质、粗纤维、粗灰分、钙、总磷、水分等。其中粗蛋白按GB/T 6432的规定执行，粗纤维按GB/T 6434的规定执行，粗灰分按GB/T 6438的规定执行，钙含量按GB/T 6436的规定执行，总磷按GB/T 6437的规定执行，水分按GB/T 6435的规定执行。

7.3.2 酶解指标及其检测方法

酶解指标主要包括酸溶蛋白、水苏糖、棉籽糖、大豆球蛋白、β-伴大豆球蛋白。酸溶蛋白按GB/T 22492的规定执行；水苏糖、棉籽糖按GB/T 22491的规定执行；大豆球蛋白、β-伴大豆球蛋白按附录A的规定执行。

附 录 A
（规范性）
大豆蛋白预消化饲料中大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白的测定方法 酶联免疫法

A.1 范围

本部分规定了大豆蛋白预消化饲料中大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白的酶联免疫测定方法。

本部分适用于大豆蛋白预消化饲料中大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白的测定。

A.2 原理

在酶标板微孔条上预包被大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白抗原，样品中的大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白和预包被的抗原竞争大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白抗体，加入酶标二抗后，用TMB底物显色，样品吸光度值与其所含大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白的含量呈负相关，与校准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数即可得出样品中大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白的含量。

A.3 试剂和材料

A.3.1 大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白酶联免疫测定试剂盒中的试剂

A.3.1.1 浓缩样品提取液

A.3.1.2 样品稀释液

A.3.1.3 浓缩洗液

A.3.1.4 酶标板

A.3.1.5 校准品

A.3.1.6 大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白抗体工作液

A.3.1.7 大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白酶标试剂

A.3.1.8 底物液A

A.3.1.9 底物液B

A.3.1.10 终止液

A.3.1.11 盖板膜

A.3.1.12 除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

A.3.2 试剂配制

A.3.2.1 样品提取工作液的配制 将浓缩样品提取液（A.3.1.1）用双蒸水或去离子水按测定试剂盒说明书要求的体积比进行稀释，用于样品中大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白的提取。

A.3.2.2 洗涤工作液的配制 将浓缩洗液（A.3.1.3）用双蒸水或去离子水按测定试剂盒说明书要求的

体积比进行稀释，用于酶标板的洗涤。

A.4　仪器和设备

A.4.1　小型粉碎机

A.4.2　分样筛 60目

A.4.3　分析天平 感量0.1mg

A.4.4　具塞三角瓶 100mL

A.4.5　电动振荡器

A.4.6　微量连续可调取液器及配套吸头：10μL～100μL

A.4.7　恒温培养箱

A.4.8　酶标仪 内置450nm滤光片

A.5　分析步骤

A.5.1　试样准备

将待检样品粉碎成60目以上颗粒，称取0.1g（根据所测样品中大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白的预估值高低可适当调整，精确至0.1mg)样品加入到配好的30mL样品提取工作液中，于25℃振荡提取12h～16h，静置10min～20min，取上清液用样品稀释液稀释到适合的工作浓度。

A.5.2　样品检测

A.5.2.1　平衡　将测定试剂盒（A 3.1）从冷藏环境中取出，置于室温（20℃～25℃）平衡 30min 以上，注意每种液体试剂使用前均须摇匀。

A.5.2.2　取出需要数量的酶标板条。

A.5.2.3　编号　将样品和校准品对应微孔按序编号，每个样品和校准品做 2 孔平行，并记录校准品孔和样品孔所在的位置。

A.5.2.4　加校准品/样品　将 6 种校准品以及待测样品各 50μL 加到对应的微孔中，再加入抗体工作液 50μL/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置 37℃避光环境中反应 30min。

A.5.2.5　洗板 小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液 300μL/孔充分洗涤 5 次，每次浸泡 10s，用吸水纸拍干（拍干后未清除的气泡可用干净的枪头戳破）。

A.5.2.6　加酶标试剂　加入酶标试剂 100μL/孔，轻轻振荡均匀，用盖板膜盖板后置 37℃避光反应 30min，取出洗板，洗板操作见 A.5.2.5。

A.5.2.7　显色　将等体积底物液 A 与底物液 B 放入干净容器中，振荡混匀。加入 AB 混合液 100μL/孔，用盖板膜盖板后，置 37℃避光反应 15min。

A.5.2.8　测定　加入终止液 50μL/孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450nm 处（双波长 450/630nm 检测更佳），在 5min 内读取所有样品吸光度值并记录保存。

A.5.3 结果计算

A.5.3.1 百分吸光率的计算

校准品或样品的百分吸光率等于校准品或样品的百分吸光度值的平均值（双孔）除以第一个标准（0标准）的吸光度值，再乘以100%，如式（A.1）所示。

$$\alpha（\%）=\frac{B}{B_0}\times 100\% \quad \text{(A.1)}$$

式中：

α—百分吸光率

B—校准品溶液或样品溶液的平均吸光度值；

B_0—校准品的平均吸光度值。

A.5.3.2 标准曲线的绘制与计算

以校准品百分吸光率为纵坐标，以大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白校准品浓度的对数为横坐标，绘制标准曲线图。将样品的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样品所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品中大豆球蛋白/β-伴大豆球蛋白的实际浓度。

A.6 精密度

批内变异系数不得超过10%。

批间变异系数不得超过15%。