



# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—202X  
代替 NY/T2218-2012

## 饲料原料 发酵豆粕

Feed material—Fermented soybean meal

(公开征求意见稿)

20XX—XX—XX 发布

20XX—XX—XX 实施

中华人民共和国农业农村部

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC76)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院饲料研究所。

本文件主要起草人：王建华、滕达、李爱科、王黎文、王秀敏、毛若雨、郝娅。

本文件所替代的历次版本发布情况为：

——NY/T 2218-2012。

本文件代替NY/T 2218-2012，与原标准相比，除编辑性修改外，主要技术内容差异如下：

——修改了范围，删除“大豆粕为主要原料(≥95%)”的规定，改为“大豆粕为主要原料(≥98%)”(见1)；删除“以麸皮、玉米皮等为辅助原料”；

——修改了规范性引用文件，删除“GB/T 6432 饲料中粗蛋白测定方法”的规定，改为“GB/T 6432 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法”；删除“GB/T 6434 饲料中粗纤维含量的测定”的规定，改为“GB/T 6434 饲料中粗纤维的含量测定 过滤法”；删除“GB/T 6435 饲料中水分和其他挥发性物质含量的测定”的规定，改为“GB/T 6435 饲料中水分的测定”；删除“GB/T 6438 饲料中粗灰分的测定方法”的规定，改为“GB/T 6438 饲料中粗灰分的测定”；删除“GB/T 8381 饲料中黄曲霉毒素B1的测定 半定量薄层色谱法”和“GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定”；增加了“GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定”；增加了“GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差”；增加了“GB/T 32141 饲料中挥发性盐基氮的测定”；增加了GB/T 19541 饲料原料 豆粕；增加了；删除“QB/T 2653 大豆肽粉”的规定，改为“GB/T 22492 大豆肽粉”(见2)；

——增加了“4.1 原料要求 原料应符合《饲料原料目录》的规定，应来源于大豆，不得添加豆粕以外的蛋白源物质如皮革粉、羽毛粉、肉骨粉和无机氮源等。”(见4.1)；

——修改了外观与性状，“外观呈浅黄色到浅棕色，色泽均匀一致，无结块；无异物，无虫蛀；无异臭味且有淡的酵香味；且不得掺入发酵豆粕产品以外的物质(如皮革粉、羽毛粉、肉骨粉和无机氮源等)。”修改为“浅黄色到浅棕色粉状物，色泽均匀一致，无结块；无异物，无虫蛀；具有淡的酵香味，无异臭味。”(见4.2)；

——修改了4.3，“技术指标”修改为“理化指标”；“饲料原料发酵豆粕产品的技术指标应符合表1的要求”修改为“应符合表1的要求”(见4.3)；

——修改了表1的表题，“表1 饲料原料发酵豆粕产品的技术指标”修改为“表1 理化指标”；

——增加了粗蛋白质量等级指标(见表1)；

——修改了粗纤维和粗灰分2个项目的限量规定(见表1)；

——增加了氢氧化钾蛋白质溶解度、β-伴大豆球蛋白、挥发性盐基氮3个项目的限量规定(见表1)；

——删除卫生指标中“饲料原料发酵豆粕产品的卫生指标应符合表2的要求，其余按GB 13078的规定执行。”及表2的规定，改为“4.4 卫生指标 应符合GB 13078要求。”(见4.4)；

——试验方法中增加了氢氧化钾蛋白质溶解度、 $\beta$ -伴大豆球蛋白、挥发性盐基氮的检测方法（见6.8、6.11、6.12）；

——修改了组批，删除“6.1.1 批 同一批投料、同一条生产线、同一班次的产品为1批。”改为“7.1 组批 以相同材料、相同生产工艺、连续生产或同一班次生产的同一规格的产品为一批，但每批产品不得超过30 t。”（见7.1）；

——修改了出厂检验，删除“6.1 出厂检验 每批产品均进行出厂检验，出厂检验由生产单位检验部门执行，检验合格签发产品合格证。”和“6.1.2 出厂检验项目 本标准规定的感官性状、水分、粗蛋白质、尿素酶活性、酸溶蛋白为出厂检验项目。”，的规定，改为“7.2 出厂检验 所列项目中，外观与性状、粗蛋白质、水分、尿素、酸溶蛋白为出厂检验项目。”（见7.2）；

——增加型式检验中“a) 更改主要原辅料和配料；b) 更改关键工艺；c) 停产后恢复生产；d) 国家质量监督机构提出进行型式检验的要求”改为“新产品投产时；生产工艺、配方或主要原料来源有较大改变，可能影响产品质量时；产品停产3个月以上，恢复生产时；出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时；饲料行政管理部门提出检验要求时。”（见7.3）；

——修改了判定规则，删除“7.1 在保证产品质量的前提下，生产单位可根据工艺、配方、设备、原料等变化情况，自行确定每批产品出厂检验的样品数量。7.2 以本标准的有关检测方法和要求为依据进行判定。检验结果中，大肠菌群及饲料卫生标准GB 13078中规定的微生物项目任一项不符合本标准要求时，判定该批产品为不合格品，不得复检；若是其它项不合格，应重新从该批次产品中加倍抽样复验，复验结果仍有一项不合格，判定该批产品为不合格品。”的规定，改为“7.4.1 所检验项目全部合格，判定为该批次产品合格。7.4.2 检验结果中有任何指标不符合本文件规定时，可自同批产品中重新加倍取样进行复检。若复检结果仍不符合本文件规定，则判定该批产品不合格。微生物指标不得复检。7.4.3 各项目指标的极限数值判定按GB/T 8170中修约值比较法执行。7.4.4 检验结果判定的允许误差按GB/T 18823规定执行。”（见7.4）；

——修改了贮存，“产品应贮存于阴凉、干燥处”修改为“贮存时防止日晒、雨淋，禁止与有毒有害物质混储。”（见8.4）；

——修改了保质期，“180天。”修改为“未开启包装的产品，在规定的运输、贮存条件下，原包装自生产之日起的保质期为6个月。”（见8.5）；

——增加了附录B。

本标准附录A、B为规范性附录。

# 饲料原料 发酵豆粕

## 1 范围

本标准规定了饲料原料发酵豆粕的要求、试验方法、检验及判定规则、标志、包装、运输、贮存和保质期。

本标准适用于以大豆粕为主要原料（≥98%），使用农业部《饲料添加剂品种目录》中批准使用的微生物菌种进行固态发酵，并经干燥制成的蛋白质饲料原料产品。

## 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 191 包装储运图示标志
- 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 6438 饲料中粗灰分的测定
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB/T 8622 饲料用大豆制品中尿素酶活性的测定
- GB 10648 饲料标签
- GB 13078 饲料卫生标准
- GB/T 14698 饲料显微镜检查方法
- GB/T 14699.1 饲料 采样
- GB/T 18246 饲料中氨基酸的测定
- GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差
- GB/T 19541 饲料原料 豆粕
- GB/T 22492 大豆肽粉
- GB/T 32141 饲料中挥发性盐基氮的测定
- 国家质量监督检验检疫总局令[2005]第75号《定量包装商品计量监督管理办法》
- 饲料原料目录

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 技术要求

#### 4.1 原料要求

原料应符合《饲料原料目录》的规定，应来源于大豆，不得添加豆粕以外的蛋白源物质如皮革粉、羽毛粉、肉骨粉和无机氮源等。

#### 4.2 外观与性状

浅黄色到浅棕色粉状物，色泽均匀一致，无结块；无异物，无虫蛀；具有淡的酵香味，无异臭味。

#### 4.3 理化指标

应符合表1的要求。

表1 理化指标

项 目	指 标	
	一级	二级
粗蛋白质/%	≥ 50.0	45.0
粗纤维/%	≤	7.0
粗灰分/%	≤	7.50
水分/%	≤	12.0
酸溶蛋白（占粗蛋白质比例）/%	≥	8.0
赖氨酸/%	≥	2.50
氢氧化钾蛋白质溶解度/%	≥	60.0
尿素酶/U/g	≤	0.10
水苏糖/%	≤	1.0
β-伴大豆球蛋白/mg/g	≤	80.0
挥发性盐基氮/ mg/100g	≤	75.0
注：各项指标必须全部符合相应等级的规定。		

#### 4.4 卫生指标

应符合GB 13078要求。

#### 5 取样

按GB/T 14699.1规定执行。

#### 6 试验方法

##### 6.1 外观与性状检验

从抽取的样品中，取适量倒在白纸或白瓷板上，在光线充足的条件下，观察颜色和状态，并闻其气味。

##### 6.2 粗蛋白质

按GB/T 6432执行，采样时无菌操作。

### 6.3 粗纤维

按GB/T 6434执行。

### 6.4 粗灰分

按GB/T 6438执行。

### 6.5 水分

按GB/T 6435执行。

### 6.6 酸溶蛋白

按GB/T 22492中附录B执行。

### 6.7 赖氨酸

按GB/T 18246执行。

### 6.8 氢氧化钾蛋白质溶解度

按GB/T 19541中附录A执行。

### 6.9 尿素酶

按GB/T 8622执行

### 6.10 水苏糖

按附录A执行。

### 6.11 $\beta$ -伴大豆球蛋白

按附录B执行。

### 6.12 挥发性盐基氮

按GB/T 32141中附录A执行。

## 7 检验规则

### 7.1 组批

以相同材料、相同生产工艺、连续生产或同一班次生产的同一规格的产品为一批，但每批产品不得超过30 t。

### 7.2 出厂检验

所列项目中，外观与性状、粗蛋白质、水分、尿素、酸溶蛋白为出厂检验项目。

### 7.3 型式检验

型式检验项目为第4章规定的所有项目。在正常生产情况下，每半年至少进行1次型式检验。有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

- a) 新产品投产时；
- b) 生产工艺、配方或主要原料来源有较大改变，可能影响产品质量时；
- c) 产品停产3个月以上，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) 饲料行政管理部门提出检验要求时。

#### 7.4 判定规则

7.4.1 所检验项目全部合格，判定为该批次产品合格。

7.4.2 检验结果中有任何指标不符合本文件规定时，可自同批产品中重新加倍取样进行复检。若复检结果仍不符合本文件规定，则判定该批产品不合格。微生物指标不得复检。

7.4.3 各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 中修约值比较法执行。

7.4.4 检验结果判定的允许误差按 GB/T 18823 规定执行。

### 8 标签、包装、运输、贮存和保质期

#### 8.1 标签

按GB 10648执行。

#### 8.2 包装

包装材料应无毒、无害、防潮。

#### 8.3 运输

运输中防止包装破损、日晒、雨淋，禁止与有毒有害物质共运。

#### 8.4 贮存

贮存时防止日晒、雨淋，禁止与有毒有害物质混储。

#### 8.5 保质期

未开启包装的产品，在规定的运输、贮存条件下，原包装自生产之日起的保质期为6个月。

## 附录 A (规范性附录)

### 发酵豆粕水苏糖含量测定方法

#### A.1 方法原理

采用高效液相色谱法(HPLC法)测定发酵豆粕中水苏糖含量。

#### A.2 试剂

所用的水为GB/T 6682中规定的一级水。

A.2.1 水苏糖标准品为色谱纯产品。

A.2.2 乙腈为色谱纯。

#### A.3 仪器设备

A.3.1 高效液相色谱仪。

A.3.2 探头式超声仪。

A.3.3 微膜过滤器(0.22 μm)。

A.3.4 实验室用粉碎机。

A.3.5 样品筛:孔径0.25 mm。

A.3.6 分析天平:感量0.0001 g。

A.3.7 离心机:转速为12000 r/min。

#### A.4 分析

##### A.4.1 标样的制备

分别精确称取水苏糖0.5000 g,用水溶解并定容至50 mL,即为10 g/L储备液,经适当稀释后制成水苏糖标准溶液。

标准溶液使用前配制。

##### A.4.2 样品的制备

精确称取2.000 g经粉碎过筛(孔径0.25 mm)的发酵豆粕样品,用20 mL水溶解,采用25 kHz、探头式超声仪浸提,400 W,15 min,将浸提液于70 °C水浴1h,加入0.5 g三氯乙酸,混匀后冰浴2h,在12000 r/min条件下离心10 min,取上清液,0.22 μm滤膜过滤后作为样品溶液,取10 μL样品液进行HPLC分析,样品制备后立即测定。

##### A.4.3 样品的测定

按HPLC法测定处理好的发酵豆粕样品中的水苏糖含量。重复测定2次。采用折光率检测器,色谱柱(氨基键合固定相柱,柱长250 mm,内径4.1 mm或其他可分析单糖和低聚糖的性能相当的色谱柱),柱温30 °C,流动相乙腈-水(75:25),流速1.0 mL/min,检测波长280 nm。水苏糖的最低检出限为0.25 g/L~0.45 g/L。

#### A.5 结果计算

以色谱峰面积对标准溶液浓度进行线性回归。根据样品色谱峰面积对照水苏糖的标准曲线计算样品浓度。

#### A.6 精密度

##### A.6.1 重复性

在同一实验室,由同一操作人员完成的两个平行测定结果,相对偏差不大于2%;以两次平行测定结果的算术平均值为测定结果。

##### A.6.2 再现性

在不同实验室,由不同操作人员用不同的仪器设备完成的两个测定结果,相对偏差不大于4%。



## 附 录 B (规范性附录)

### 发酵豆粕β-伴大豆球蛋白含量测定方法

#### B.1 方法原理

采用间接竞争酶联免疫法(ELISA法)。在酶标板上预包被β-伴大豆球蛋白抗原,样品中的β-伴大豆球蛋白和预包被的抗原竞争β-伴大豆球蛋白抗体,加入酶标二抗后,用TMB底色显色,样品吸光度值与其所含β-伴大豆球蛋白的含量呈负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数即可得出样品中β-伴大豆球蛋白的含量。

#### B.2 试剂

所用的水为GB/T 6682中规定的一级水。

##### B.2.1 弗氏不完全佐剂

B.2.2 包被缓冲液(0.05 mol/L, pH 9.6的碳酸缓冲液):准确称取1.59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 和2.93 g  $\text{NaHCO}_3$ ,将其混溶于1000 mL蒸馏水中。

B.2.3 封闭液:用包被缓冲液配制5%的脱脂牛奶。

B.2.4 30×浓缩样品提取液:181.7 g Tris、73 mL HCl和21 mL β-巯基乙醇,定容至1000 mL蒸馏水中。

B.2.5 样品稀释液:0.9%氯化钠溶液。

B.2.6 抗体工作液:5.0 g 牛血清白蛋白(BSA)、1.0 mL Proclin-300、100 mL 0.2 mol/L pH7.4 PBS、0.05 g 亮蓝、β-伴大豆球蛋白抗体1 mg。

B.2.7 洗液:0.3 mol/L pH7.4 PBS溶液1000 mL加4% Tween-20。

B.2.8 酶标试剂:10.0 g BSA、29.4 g 氯化钠、100 mL 小牛血清、1.0 mL Proclin-300、0.2 mol/L pH7.4 PBS 100 mL和0.5 mg 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体,定容至1000 mL蒸馏水中。

B.2.9 显色液A:40.0 g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、10.0 g 一水柠檬酸和0.5 g 过氧化氢脲,定容至1000 mL。

B.2.10 显色液B:2.0 g 一水合柠檬酸、150 mL 无水甲醇、0.55 g 四甲基联苯胺(TMB)和100 mL N,N-二甲基甲酰胺,定容至1000 mL蒸馏水中。

B.2.11 终止液:2 mol/L 硫酸溶液。

B.2.12 标准系列溶液:0 μg/mL、0.2 μg/mL、0.4 μg/mL、1.6 μg/mL、6.4 μg/mL、25.6 μg/mL β-伴大豆球蛋白

#### B.3 仪器设备

B.3.1 实验室用样品粉碎机:粉碎时应不产生强热。

B.3.2 样品筛:孔径60目。

B.3.3 分析天平:感量0.0001 g。

B.3.4 离心机:转速≥4000 r/min。

B.3.5 分光光度计

#### B.4 分析

##### B.4.1 β-伴大豆球蛋白多克隆抗体的制备

B.4.1.1 抗原制备:将低温脱脂未变性的大豆粉以1:10的料水质量比分散于温度为40-50℃、pH为8.0-11.0(1 mol/L NaOH调至)的水中,除去非可溶性成分;分散过程在机械搅拌或超声波处理的条件下处理45 min;调整溶液离子强度为0.05-1.0, pH为5.0-6.0(35% HCl调至),在4000-7000 r/min离心,得到的上清液用酸调pH至4.0-5.0(35% HCl调至),然后在2000-4000 r/min离心,得到的沉淀物为β-伴大豆球蛋白。

B.4.1.2 抗体制备：适量弗氏不完全佐剂和纯化的 $\beta$ -伴大豆球蛋白混匀，在旋涡振荡器上乳化。免疫两只新西兰白兔，采用6 wk免疫程序。兔子先适应性喂养1 wk。兔子免疫前先于一侧耳缘抽取2 mL静脉血，4 °C静置过夜，取血清作阴性对照。对脊柱两侧进行多点背部皮下注射（剂量为100  $\mu$ g 免疫原/支）；初次免疫后第15 d，再用弗氏不完全佐剂抗原腹腔静脉加强免疫一次，一周一次，共3次。免疫后的第25 d和第38 d取血，间接ELISA法测定抗体效价，Western blot法观察免疫反应条带，检测免疫效果。效价达到要求后，用无佐剂抗原免疫1次，免疫第3 d后颈动脉采血收集血清，3000 r/min离心20 min。收获的抗血清用甘油1:1稀释，于-20 °C保存。

#### B.4.2 预包被抗原酶标板的制备

B.4.2.1 包被：用包被缓冲液将制备的 $\beta$ -伴大豆球蛋白稀释至最佳工作浓度，用移液枪准确移至酶标板，每个孔100  $\mu$ L，密封于4 °C过夜。

B.4.2.2 封闭：用洗液洗涤3次，每次90 s（简称洗涤，下同），然后拍干。每个孔加入200  $\mu$ L封闭液，37 °C温育1 h，洗涤1次，然后拍干，放入自封袋中，于4 °C干燥保存。

#### B.4.3 样品的制备

B.4.3.1 称样：将待测样品粉碎成60目以上颗粒，称取0.3000 g样品于50 mL离心管中；

B.4.3.2 提取：装有样品的50 mL离心管中再加入30 mL 1 $\times$ 样品提取工作液，于25 °C震荡提取16 h；

B.4.3.3 离心：震荡后静置2 min，取上层液体于离心机中4000 r/min离心5 min；

B.4.3.4 稀释：取上清液用1 $\times$ 样品稀释工作液稀释70倍（为减小误差分两步稀释：先取上清100  $\mu$ L加600  $\mu$ L 1 $\times$ 样品稀释工作液混匀，再取混合液100  $\mu$ L加900  $\mu$ L 1 $\times$ 样品稀释工作液混匀），待测。

#### B.4.4 测定步骤

B.4.4.1 将所需试剂和酶标板从4 °C冰箱中取出，回温至20-25 °C，试剂使用前摇匀。

B.4.4.2 编号：将样品和对照品对应酶标板微孔按序编号，每个样品和对照品做2孔平行，并记录对照品孔和样品孔所在的位置。

B.4.4.3 加样：将对照品1-6（0  $\mu$ g/mL、0.2  $\mu$ g/mL、0.4  $\mu$ g/mL、1.6  $\mu$ g/mL、6.4  $\mu$ g/mL及25.6  $\mu$ g/mL）以及待测样品各取50  $\mu$ L加至对应的酶标板微孔中，再加入抗体工作液50  $\mu$ L/孔，轻轻震荡混匀。盖上盖板膜，37 °C避光反应30 min。

B.4.4.4 洗板：小心揭开盖板膜，倒掉微孔中液体，加入洗涤工作液300  $\mu$ L，浸泡10 s后倒掉，重复洗涤4次，于吸水纸上拍干。

B.4.4.5 加酶标试剂：加入酶标试剂100  $\mu$ L/孔，盖上盖板膜，37 °C，避光反应30 min，取出洗板。

B.4.4.6 显色：将等体积显色液A与显色液B混匀（显色液现用现混，5 min内用完，混匀时请勿剧烈震荡）；每孔加入混合液100  $\mu$ L，盖上盖板膜，37 °C，避光反应15 min。

B.4.4.7 终止：每孔加入终止液50  $\mu$ L，轻轻振荡混匀，立即于450/630 nm双波长下读取吸光度值。

### B.5 结果计算

#### B.5.1 百分吸光率计算

对照品或样品的百分吸光率等于对照品或样品的吸光度值的平均值（双孔）除以对照品1的吸光度值的平均值，再乘以100%。

#### B.5.2 标准曲线的绘制与计算

以对照品百分吸光率为纵坐标，以 $\beta$ -伴大豆球蛋白对照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，乘以其对应的稀释系数即为样品中 $\beta$ -伴大豆球蛋白的实际浓度。

### B.6 精密度

#### B.6.1 重复性

在同一实验室，由同一操作人员完成的两个平行测定结果，批内变异系数 $\leq$ 12%；以两次平行测定结果的算术平均值为测定结果。

### B. 6.2 再现性

在不同实验室，由不同操作人员用不同的仪器设备完成的两个测定结果，批间变异系数 $\leq 15\%$ 。

---

# 中华人民共和国农业行业标准

## 《饲料原料 发酵豆粕》

### 编制说明

(公开征求意见稿)

起草单位：中国农业科学院饲料研究所

## 目 录

一、标准修订背景及任务来源.....	错误！未定义书签。
1、标准修订背景.....	错误！未定义书签。
2、任务来源.....	错误！未定义书签。
3、标准的起草单位和起草人.....	3
二、主要工作过程.....	4
1、标准修订的申报.....	4
2、成立修标小组，进行方法验证，形成标准草案.....	4
3、征求意见及征求意见汇总处理.....	5
4、召开预审会，处理专家意见，形成送审稿标准修订背景.....	5
三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....	5
1、采用标准情况.....	5
2、范围的修改.....	11
3、规范性引用文件的修改.....	11
4、质量等级指标的修改与验证.....	11
5、补充型式检验规定.....	27
6、修改保存条件.....	27
7、修改保质期.....	27
8、饲料用发酵豆粕的质量等级指标和卫生指标汇总.....	27
四、采用的国际标准.....	28
五、与现行法律法规和强制性标准的关系.....	28
六、重大分歧意见的处理经过和依据.....	28
七、标准作为强制性或推荐性标准的意见.....	29
八、贯彻标准的要求和措施建议.....	29
九、废止现行有关标准的建议.....	29
十、其他应予说明的事项.....	29

# 一、标准修订背景及任务来源

## 1 标准修订背景

我国是世界最大养殖生产国，饲料蛋白 60%以上依赖进口，动物性高档蛋白资源更为匮乏。豆粕是我国第二大饲料原料和第一大饲料蛋白原料，年消费量 6000 多万吨，从供求关系和规模看，饲用豆粕毫无疑问是我国饲料业第一大敏感原料和供给瓶颈因子，且具有结构性、长期性、全国性特点，是我国畜产品第一重要的原料价格决定因子，因此我国菜篮子中的肉蛋奶物价水平在很大程度上是由美洲国家的大豆产业决定的，尤其是在新世纪初年我国农业全面进入 WTO 纳入世界经济格局、耕地面积无法增加且粮食作物面积无法退让的国内形势下，我国畜牧业、饲料产业应对豆粕短缺压力的缓冲能力变得更为脆弱，惟其如此，围绕豆粕质量改进工作的重要性更益凸显和刻不容缓。豆粕中包含多种抗营养因子如大豆抗原蛋白(致敏因子)、脂肪氧化酶、胰蛋白酶抑制剂、低聚糖、大豆凝血素、脲酶等。其中致敏蛋白含量占豆粕总蛋白 65%以上（其中大豆球蛋白和 $\beta$ -伴大豆球蛋白分别占大豆籽实总蛋白的 40%和 25%），这是导致幼年动物或者动物敏感生育期生理性腹泻和消化吸收障碍等的主要原因，成为制约豆粕在动物饲料中有效利用的质量瓶颈。微生物发酵法可有效分解和破坏豆粕中的抗营养因子，提高豆粕的营养价值。发酵粕类技术与产品在过去十年成为生物饲料中发展最快的版块。发酵豆粕因其技术复杂、执行难度大、发展快、影响面广，所以加强其安全监控尤为重要。

发酵豆粕是利用现代生物工程发酵菌种技术与中国传统的固体发酵技术相结合，以豆粕为主要原料，接种微生物，通过微生物的发酵最大限度地消除豆粕中的抗营养因子，并产生益生菌、小肽等活性物质。发酵豆粕起于民间，以行业自主创造为主，是中国传统固态发酵兼顾液态发酵形成的快速发酵，其菌种、工艺和设备具多样性和复杂性：

- (1) 发酵菌种主要有芽孢杆菌、酵母菌和乳酸菌等。
- (2) 发酵工艺：液体制种，与豆粕混匀后进行固态发酵，介于天然发酵和人工发酵之间，发酵期间对温度、含水量、通气量、时间等根据产品需求进行调控。
  - 1) 根据发酵菌株种类分为单菌发酵、多菌混合发酵，这其中根据蛋白降解需求可菌酶联合发酵；
  - 2) 根据发酵菌株对氧的需求分为厌氧发酵、好氧发酵及兼性厌氧发酵；
  - 3) 根据生产模式分为浅层发酵和深层发酵，浅层发酵厚度不超过 10cm，发酵设备有履带式自动发酵机、水泥地面薄层铺设和架式薄层铺设等；深层发酵厚度多数在 100cm 左右，发酵设备有发酵罐、堆池、箱式（木箱、铁皮箱内衬塑料袋）和吨袋等，其中根据控温控氧需求可翻料。

不管发酵豆粕制备中菌种、工艺和设备如何复杂，但最终发酵豆粕产品的落脚点是豆粕在发酵中达到去害增益效果。

项目申请人牵头制定的农业行业标准 NY/T2218-2012《饲料原料发酵豆粕》已经实施 8 年，得到了行业的肯定，但在生产实践中又发现和积累了不少经验教训，亟待总结完善，因此秉承确保发酵豆粕标准制定权的公开、公正和公平的原则，期望在前期标准制定工作的基础上进一步对其补充修订。

## 2 任务来源

本标准修订任务来源于2018年农业行业标准制修订项目，项目名称：《饲料原料 发酵豆粕》修订，项目编号：2018-20-17。

## 3 标准的起草单位和起草人

本标准的起草单位为中国农业科学院饲料研究所。

本标准的主要起草人为王建华、滕达、李爱科、王黎文、王秀敏、毛若雨、郝娅。

# 二、主要工作过程

## 1 标准修订的申报

通过查阅国内外大量相关发酵豆粕研发、应用和生产的论文，于2017年10月申报“修订《饲料原料 发酵豆粕》标准”项目。

## 2 成立修标小组，进行方法验证，形成标准草案

2017年11月25日修标单位邀请中国饲料工业协会饲料标准处领导和相关单位专家以及全国发酵豆粕行业9家代表企业（按照公司名称的汉语拼音排名分别是：安徽天邦生物技术有限公司、东莞市银华生物科技有限公司、福建龙岩闽雄生物科技股份有限公司、广东希普生物科技股份有限公司、广东金肽阳生物科技有限公司、湖北邦之德牧业科技有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、上海源耀生物股份有限公司、武汉金泰得生物科技有限公司）的同行专家共26人在北京讨论发酵豆粕标准的修标建议，初步形成修标意见，在水分、粗蛋白、粗纤维、粗灰分、尿素酶活性、酸溶蛋白、赖氨酸及水苏糖等8个技术指标基础上增加 $\beta$ -伴大豆球蛋白、大豆球蛋白、氢氧化钾蛋白质溶解度、胰蛋白酶抑制剂及挥发性盐基氮等5个指标，对这13个指标做进一步分析测试和调研。

征集获得26个发酵豆粕产品样品以及3个豆粕产品各1-2公斤分别在中国农业科学院饲料研究所基因工程室、中心实验室、饲料加工室针对13个指标进行了一系列分析测试，所有检测指标在可能情况下尽量采用有效国家标准或者行业标准方法。所采样品规模代表了市场上78%以上产量的样品，所采样品的工艺覆盖率达到100%（不包含低产量的小作坊式发酵模式）。按照2016年我国发酵豆粕企业市场占有率统计（肖蒙，2017），市场占有率排名前8位的企业：上海源耀生物股份有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、湖北邦之德牧业科技有限公司、山东和实集团有限公司、武汉金泰得生物科技股份有限公司、福建龙岩闽雄生物科技股份有限公司、东莞市银华生物科技股份有限公司、全能生物科技（天津）有限公司和广东希普生物科技股份有限公司等均在本次修标采样范围，其产量市场占有率达78%，另外还采集了广东金肽阳生物科技有限公司、希杰（上海）商贸有限公司、浙江科峰生物技术有限公司等3家的样品。同时，发酵豆粕应用大型企业如新希望六合股份有限公司、禾丰牧业股份有限公司和通威股份有限公司，以及发酵企业如青岛根源生物技术集团有限公司和希杰（佛山）生物科技有限公司也提供了部分指标的数据参考：

(1) 粗蛋白含量：新希望六合股份有限公司提供256个样品数据；禾丰牧业股份有限公司提供330个样品数据；通威股份有限公司提供106个样品数据；青岛根源生物技术集团有限公司检测发酵豆粕样品859个。

(2) 粗纤维含量：新希望六合股份有限公司提供42个样品数据；禾丰牧业股份有限公司提供41个样品数据；青岛根源生物技术集团有限公司提供1321个样品数据。

(3) 粗灰分含量：新希望六合股份有限公司提供248个样品数据；禾丰牧业股份有限公司提供174个样品数据；通威股份有限公司提供106个样品数据；青岛根源生物技术集团有限公司提供1321个样品数据；希杰（佛山）生物科技有限公司提供11个样品数据。

(4) 水分含量：新希望六合股份有限公司提供258个样品数据；禾丰牧业股份有限公司提供299个样品数据；通威股份有限公司提供105个样品数据；青岛根源生物技术集团有限公司提供1308个样品数据。

2019年1月12日修标单位邀请农业农村部畜牧业司饲料处、中国饲料工业协会质量标准与认证领导和中国农业大学动物科技学院、中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所、国家粮食局科学研究院、东北农业大学及浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所等相关单位专家以及全国发酵豆粕行业17家代表企业的同行专家共46人（按照公司名称的汉语拼音排名分别是：广东金肽阳生物科技有限公司、上海源耀生物股份有限公司、广东希普生物科技股份有限公司、希杰（上海）商贸有限公司、正大集团、益海嘉里投资有限公司、迈安德集团有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、山东和实集团有限公司、福建龙岩闽雄生物科技股份有限公司、浙江科峰生物技术有限公司、深圳金新农科技股份有限公司、全能生物科技（天津）有限公司、武汉金泰得生物科技有限公司、湖北邦之德牧业科技有限公司、青岛蔚蓝生物集团有限公司、浙江博仕佳生物技术有限公司和安佑集团）在北京讨论确定了12个修标质量指标，包括粗蛋白质、粗纤维、粗灰分、 $\beta$ -伴大豆球蛋白、大豆球蛋白、水分、酸溶蛋白、赖氨酸、尿素酶活性、胰蛋白酶抑制剂、水苏糖、挥发性盐基氮等。

走访湖北（湖北邦之德牧业科技有限公司、武汉金泰得生物科技有限公司）、山东（青岛根源生物技术集团有限公司、山东和实集团有限公司）、天津（全能生物科技（天津）有限公司）、广东（希杰（佛山）生物科技有限公司、广东希普生物科技股份有限公司）、广西（益海嘉里大海粮油工业有限公司（防城港））等8家同行业相关企业发酵豆粕的生产现场，对发酵工艺、菌种、设备、质量控制等方面进行了调研。

湖北邦之德牧业科技有限公司、江苏盐城源耀生物科技股份有限公司、安徽希普生物科技股份有限公司、湛江银恒生物科技股份有限公司、全能生物科技（天津）有限公司、日照东维生物饲料有限公司、浙江科峰生物生物技术有限公司、武汉金泰得生物科技有限公司、广东金肽阳生物科技股份有限公司、希杰（佛山）生物科技有限公司等10家发酵豆粕企业给指标单位提供了企业标准文案。基于两次会议、31家单



位的69位同行专家的2天讨论论证、5500字会议纪要，8家企业调研、10家企业标准、文献参考以及12个指标的测定形成《饲料原料 发酵豆粕》标准修标草案及编制说明草案。

### 3 征求意见及征求意见汇总处理

制标单位从2019年8月28日起将该标准征求意见稿、编制说明和征求意见稿意见回执表一并通过电子邮箱发送给国内17个省62家不同单位的87名同行专家（包括28家大学与科研院所、3家国家或者部级饲料质量检测中心和31家公司）广泛征求意见，截止到2019年10月17日收到的意见回复统计情况如下：收到16个省26家单位的38位同行专家（包括12家大学与科研院所、2家国家或者部级饲料质量检测中心和12家公司）的意见，不同单位具体意见和反馈情况见附表。未采纳或者部分采纳，以及疑问都在函审意见出表备注中作了简要说明。

### 4 召开预审会，处理专家意见，形成送审稿

2019年12月8日在北京，制标单位中国农业科学院饲料研究所组织专家对农业行业标准《饲料原料 发酵豆粕》（征求意见稿）进行会议审查。专家组由佟建明（中国农业科学院北京畜牧兽医研究所）、谯仕彦（中国农业大学动物科学技术学院）、王云山（中国科学院过程工程研究所）、张若寒（泰高集团）、郭吉原（新希望六和股份有限公司）、邵彩梅（辽宁禾丰牧业股份有限公司）、张凤枰（通威股份有限公司检测中心）等七位专家组成。与会专家认为：标准数据可靠，标准预审稿可行。专家组提出进一步修改意见8条。确定了11个修标质量指标，包括粗蛋白质、粗纤维、粗灰分、 $\beta$ -伴大豆球蛋白、水分、酸溶蛋白、赖氨酸、尿素酶活性、水苏糖、挥发性盐基氮、氢氧化钾蛋白质溶解度等。制标单位严格按照预审专家意见和要求，对预审提出的8条意见逐一认真修改了标准征求意见稿，其中针对 $\beta$ -伴大豆球蛋白的酶联免疫检测方法于2020年1月至7月分别在中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所及生化工程国家重点实验室（中国科学院过程工程研究所）进行了方法验证。于2020年9月15日将修改完善的《饲料原料 发酵豆粕》（送审稿）报至全国饲料工业标准化技术委员会。

## 三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

### 1 采用标准情况

#### 1.1 编辑依据和相关标准以及参考采用的情况

本标准立足于本行业发展现状，同时充分关注行业发展趋势，以相关科研成果为依据，参考相关标准，并结合本实验室实验情况和行业实验室情况修订了本标准。

##### 1.1.1 饲料用发酵豆粕感官指标的编制依据

主要通过对全国知名发酵豆粕企业的发酵豆粕产品的比较分析，及参考国家标准标准GB/T 19541-2017《饲料原料 豆粕》和已有文献报道，制定了发酵豆粕的候选感官要求指标。

表1 饲料用发酵豆粕的感官指标参考依据

项目	参考要求			来自 13 个发酵豆粕企业 26 个样品的观察结果	本标准要求	备注（依据）
	饲料原料 豆粕 GB/T 19541-2017	文献 <sup>a</sup>	文献 <sup>b</sup>			
外观	呈浅黄色或浅棕色或红褐色，不规则的碎片状或粗颗粒状或粗粉状	棕黄色，色泽均匀	黄色，颜色一致	浅黄色到深黄色	呈浅黄色到浅棕色，色泽均匀一致，流散性好，无结块	根据标准、文献资料和所收集企业样品的比较分析而定
杂质	无发酵、霉变、虫害	---	---	无变质发酵、无霉变、结块、虫蛀	无异物，无虫蛀	根据标准、文献资料和所收集企业样品的比较分析而定
气味	无异味异臭	无氨臭	淡淡的醇香和芬芳，无霉味	淡的发酵醇香味	无异臭味且有淡的醇香味	根据标准、文献资料和所收集企业样品的比较分析而定

注：文献<sup>a</sup>：葛向阳, 2010; 文献<sup>b</sup>：徐欢根, 2007

#### 1.1.2 饲料用发酵豆粕技术指标编制依据

主要通过对全国13家发酵豆粕企业的样品的实测和10家企业标准的比较分析，参照国内外相关文献研究结果（见后参考文献），及参照本实验室实验情况和行业实验室实验情况，对能反映发酵豆粕的特征特性的基础物质（水分、粗蛋白质、粗纤维、粗灰分、赖氨酸及）、功能物质（酸溶蛋白氢氧化钾蛋白质溶解度）、有害物质（抗营养因子）（尿素酶、水苏糖、挥发性盐基氮、抗原蛋白（ $\beta$ -伴大豆球蛋白））等11个重要的候选技术指标进行认真制定。

#### 1.1.3 发酵豆粕卫生指标编制依据

通过参考中华人民共和国国家标准饲料卫生标准GB 13078-2017及相关企业内部标准，制订了发酵豆粕卫生指标。

表 2 饲料用发酵豆粕的技术指标参考依据

项目	参考依据								本修订标准 初拟要求	备注（依据）	
	饲料原料 豆粕 GB/T 19541-2017	文献 <sup>a</sup>	文献 <sup>b</sup>	文献 <sup>c</sup>	文献 <sup>d</sup>	文献 <sup>e</sup>	文献 <sup>f</sup>	文献 <sup>g</sup>			
									来自 13 个发酵豆粕企业 26 个发酵豆粕样品的观 察结果	饲料原料 发酵豆粕	进一步补充解释 说明具体原因
水分/(%)	≤12.5	---	---	<10	8.0	---	---		5.39~13.94; 平均含量 8.59%; 含量≥12.0%的样品占 3.85% (1/26)	≤12.0	根据文献资料和企业样品实测结果而定
粗蛋白质/(%)	特级品≥48.0; 一级品≥46.0; 二级品≥43.0; 三级品≥41.0	52.5	50	≥50	50	53.74	49.41		41.49~52.70%; 平均含量 47.78%; 含量≤45.0%的占 3.85% (1/26); 含量≥45.0%的样品占 96.15% (25/26); 含量≥50.0%的样品占 15.38% (4/26)	一级 ≥50.0; 二 级 ≥45.0	根据文献资料和企业样品实测结果而定
粗纤维/(%)	特级品≤5.0; 其余等级≤7.0	2.87	7.0	<4.1	7.5	3.31	---		1.73~5.96%; 平均含量 3.46%; 含量≥5.0%的样品占 3.85% (1/26)	≤7.0	根据文献资料和企业样品实测结果而定
粗灰分/(%)	≤7.0	6	7.0	<7	6.8	---	7.34		5.95~7.52%; 平均含量 6.69%; 含量≥7.0%的样品占 15.38% (4/26)	≤7.50	根据文献资料 and 所收集企业样品 实测结果而定
赖氨酸/(%)	特级品≥2.50; 一级品≥2.50; 二级品≥2.30; 三级品≥2.30								2.43~2.98%; 平均含量为 2.71%; ≤2.50%的样品占 7.69% (2/26)	≥2.50	根据文献资料 and 所收集企业样品 实测结果而定
氢氧化钾蛋白溶解度/(%)	≥73.0								40.72~87.02%; 平均 70.31%; 低于 60.0%占 11.54%	≥60.0	根据文献资料 and 所收集企业样品 实测结果而定

								(3/26)			
尿素酶活性 (U/g)	≤0.3 (U/g)	---	---	---	---	---	---	未检出	0~0.096U/g; 平均值 0.008U/g; 全部样品活性均≤0.1U/g	≤0.1	根据文献资料和企业样品实测结果而定
水苏糖/(%)	---	---	---	---	---	---	---	0~32.73	0~3.67%; 平均含量 0.50%; 含量>1.0%样品占 11.54% (3/26)	≤1.0	根据所收集企业样品实测结果而定
挥发性盐基 氮/ (mgN/100g)	---	---	---	---	---	---	---	---	27.12~171.0 mgN/100g; 平均含量 55.65 mgN/100g; 含量≥75.0mg N/100g 的 样品占 7.69% (2/26)	≤75.0	根据所收集企业样品实测结果而定
酸溶蛋白(占 蛋白比 例)/(%)	---	---	---	---	---	---	---	---	6.50~19.06%; 平均含量 12.31%; 含量<8.0%样品占 12.31% (4/26)	≥8.0	根据所收集企业样品的实测结果而定
β-伴大豆球 蛋白/(mg/g)	---	---	---	---	---	---	---	0.1~154. 3	为 0-90.50mg/g 平均值为 48.56mg/g 2 个样品含量>80mg/g 7.69% (2/26)	≤80.0	根据所收集企业样品的实测结果而定

注：文献<sup>a</sup>：章世元等，2008；文献<sup>b</sup>：柯祥军等，2008；文献<sup>c</sup>：李建，2009；文献<sup>d</sup>：杨耐德，2008；文献<sup>e</sup>：Cervantes-Pahm SK等，2010；文献<sup>f</sup>：刘欣等，2007；文献<sup>g</sup>：杨玉娟等，2016。

表 3 饲料用发酵豆粕的卫生指标参考依据

项目		参考依据				本标准初拟要求	备注（依据）
		饲料卫生标准（GB 13078-2017）	食品安全国家标准豆制品（GB/T 2712-2014）	微生物饲料添加剂技术通则（NY/T 1444）	来自 13 个发酵豆粕企业 26 个发酵豆粕样品的观察结果		
无机污染物	总砷, mg/kg	≤2	0.5	≤2.0	---	<2.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	铅, mg/kg	≤10	1.0	≤5.0	---	<10.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	汞, mg/kg	≤0.1	---	≤0.1	---	<0.10	本标准按饲料卫生标准要求执行
	镉, mg/kg	≤1	---	≤0.5	---	≤1.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	氟, mg/kg	≤150	---	---	---	≤150.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	亚硝酸盐（以 NaNO <sub>2</sub> 计）, mg/kg	≤15	---	---	---	≤15.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
真菌毒素	黄曲霉素 B <sub>1</sub> , μg/kg	≤30	5	≤10	---	≤30.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	玉米赤霉烯酮, mg/kg	≤1	---	---	---	≤1.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	脱氧雪腐镰刀菌烯醇（呕吐毒素）, mg/kg	≤5	---	---	---	≤5.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	T-2 毒素, mg/kg	≤0.5	---	---	---	≤0.50	本标准按饲料卫生标准要求执行
天然植物毒素	氰化物（以 HCN 计）, mg/kg	≤50	---	---	---	≤50.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	游离棉酚, mg/kg	≤20	---	---	---	≤20.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	异硫氰酸酯（以丙烯基异硫氰酸酯计）, mg/kg	≤100	---	---	---	≤100.0	本标准按饲料卫生标准要求执行

有机氯污染	多氯联苯（PCB，— PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153、PCB180 之和）， μg/kg	≤10	---	---	---	≤10.0	本标准按饲料卫生标准要求执行
	六六六（HCH，以α-HCH，β-HCH，γ-HCH 之和计）， mg/kg	≤0.2	---	---	---	≤0.20	本标准按饲料卫生标准要求执行
	滴滴涕（以 p,p'-DDE，o,p'-DDT，p,p'-DDD，p,p'-DDT 之和计）， mg/kg	≤0.05	---	---	---	≤0.050	本标准按饲料卫生标准要求执行
	六氯苯， mg/kg	≤0.01	---	---	---	≤0.010	本标准按饲料卫生标准要求执行
微生物污染物	沙门氏菌	不得检出	---	不得检出	只有 1 个样品检出； 2.4×10 <sup>3</sup> CFU/g	不得检出	本标准按饲料卫生标准执行
	凝固酶阳性葡萄球菌， CFU/g	---	金黄色葡萄球菌 不得检出	金黄色葡萄球菌 不得检出	---	---	本标准执行饲料卫生标准不列入
	志贺氏菌	---	不得检出	不得检出	---	---	本标准执行饲料卫生标准不列入

## 2 范围的修改

修改了范围，删除“大豆粕为主要原料(≥95%)”的规定，改为“大豆粕为主要原料(≥98%)”；2019年1月12日发酵豆粕标准修标会议上企业代表建议豆粕含量≥98，也有建议用纯豆粕，与会专家同时认为提高豆粕含量可以进一步降低安全风险。

## 3 规范性引用文件的修改

(1) “GB/T 6432 饲料中粗蛋白的测方法”修改为“GB/T 6432 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法”；

(2) “GB/T 6434 饲料中粗纤维测定 过滤法”修改为“GB/T 6434 饲料中粗纤维的含量测定 过滤法”；

(3) “GB/T 6438 饲料中粗灰分的测定方法”修改为“GB/T 6438 饲料中粗灰分的测定”；

(4) 删除“GB/T 6435 饲料中水分和其他挥发性物质含量的测定”，修改为“GB/T 6435 饲料中水分的测定”；

(5) 删除“GB/T 8381 饲料中黄曲霉毒素B1的测定 半定量薄层色谱法”；

(6) 删除“GB/T 18869 饲料中大肠菌群的测定”；

(7) 增加“GB/T 19541 饲料原料 豆粕”；

(8) 增加“GB/T 32141 饲料中挥发性盐基氮的测定”。

## 4 质量等级指标的修改与验证

### 4.1 修改感官性状

“无异臭味且有淡的酵香味；且不得掺入发酵豆粕产品以外的物质（如皮革粉、羽毛粉、肉骨粉和无机氮源等）。”修改为“具有淡的酵香味，无异臭味；且不得掺入发酵豆粕产品以外的蛋白源物质（如皮革粉、羽毛粉、肉骨粉和无机氮源等）。”

### 4.2 增加粗蛋白质指标分级

参照GB/T 6432《饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法》标准，由中国农业科学院饲料研究所中心实验室对来自13家企业的26个发酵豆粕进行了粗蛋白含量的测定（表4）。26个发酵豆粕样品粗蛋白质含量为41.49~52.70%，平均含量为47.78%；含量低于45.0%的样品占3.85%；含量高于45.0%的样品占96.15%（25/26）；含量高于50.0%的样品占15.38%（4/26）。

同时参考企业提供发酵豆粕粗蛋白含量测定结果：禾丰牧业股份有限公司检测发酵豆粕样品330个，粗蛋白质含量为48.0~52.91%，平均含量为50.50%；新希望六合股份有限公司检测发酵豆粕样品256个，粗蛋白质含量为43.73~54.65%，平均含量为49.09%；通威股份有限公司检测

发酵豆粕样品106个，粗蛋白质含量为46.30~55.10%，平均含量为49.10%；青岛根源生物技术集团有限公司检测发酵豆粕样品859个，粗蛋白质含量为48.32~52.13%，平均含量为50.46%。

基于2017年11月25日、2019年1月12日及2019年12月8日三次发酵豆粕标准修标会议上专家和企业代表的建议进行了粗蛋白指标分级。中国饲料成分及营养价值表（2018年29版）中国饲料库数据显示去皮大豆粕粗蛋白47.9%，大豆粕粗蛋白44.2%；按照100斤豆粕约产88-89斤发酵豆粕，并结合企业样品实测结果，本修订标准初期规定：发酵豆粕一级产品粗蛋白含量 $\geq 50.00\%$ ，二级产品粗蛋白含量 $\geq 45.00\%$ 。

**表4 发酵豆粕样品粗蛋白含量的测定**

样品代号与来源	粗蛋白，%
企业 1-1	47.32
企业 1-2	46.9
企业 2-1	47.96
企业 2-2	46.51
企业 3-1	48.07
企业 3-2	46.41
企业 3-3	41.49
企业 4-1	48.5
企业 4-2	48.47
企业 5-1	47.5
企业 5-2	46.92
企业 6-1	47.78
企业 6-2	45.67
企业 7-1	52.05
企业 7-2	45.44
企业 7-3	47.19
企业 8	52.02
企业 9-1	45.28
企业 9-2	46.1
企业 9-3	47.6
企业 10-1	48.1
企业 10-2	45.98
企业 11-1	52.7
企业 11-2	52.58
企业 12	48.74
企业 13	49.04
未发酵豆粕 1	44.16
未发酵豆粕 2	43.65
未发酵豆粕 3	40.10

注：企业样品来源一律用代号表示（下文同，不再说明）。



### 4.3 调整粗纤维指标

参照GB/T 6434《饲料中粗纤维的含量测定 过滤法》标准，由中国农业科学院饲料研究所中心实验室对来自13家企业的26个发酵豆粕进行了粗纤维含量的测定（表5）。26个发酵豆粕样品粗纤维含量为1.73~5.96%；平均含量为3.46%；含量高于7.0%的样品为零。

同时参考企业提供发酵豆粕粗蛋白含量测定结果：禾丰牧业股份有限公司检测发酵豆粕样品41个，粗纤维含量为1.71~5.77%，平均含量为4.61%；新希望六合股份有限公司检测发酵豆粕样品42个，粗纤维含量为3.10~6.50%，平均含量为4.84%；青岛根源生物技术集团有限公司检测发酵豆粕样品1321个，粗纤维含量为3.93~8.00%，平均含量为5.63%。

基于2017年11月25日、2019年1月12日和2019年12月8日三次发酵豆粕标准修标会议上专家和企业代表的建议进行了粗纤维指标上浮。去皮豆粕粗纤维 $\leq 5.00\%$ ，带皮豆粕粗纤维 $\leq 6.0\%$ ；中国饲料成分及营养价值表（2018年29版）中国饲料库数据显示去皮大豆粕粗纤维3.3%，大豆粕粗纤维5.9%；按照100斤豆粕约产88-89斤发酵豆粕，并结合企业样品实测结果，本修订标准初期规定：发酵豆粕产品粗纤维含量 $\leq 7.0\%$ 。

表5 发酵豆粕样品粗纤维含量的测定

样品代号与来源	粗纤维，%
企业 1-1	2.94
企业 1-2	3.11
企业 2-1	1.98
企业 2-2	4.27
企业 3-1	3.29
企业 3-2	2.93
企业 3-3	5.96
企业 4-1	2.6
企业 4-2	4.22
企业 5-1	2.96
企业 5-2	3.73
企业 6-1	4.34
企业 6-2	3.22
企业 7-1	3.3
企业 7-2	4.3
企业 7-3	3.43
企业 8	1.95
企业 9-1	3.12
企业 9-2	3.46
企业 9-3	4.58
企业 10-1	3.47
企业 10-2	4.66

企业 11-1	2.58
企业 11-2	1.73
企业 12	3.5
企业 13	4.43
未发酵豆粕 1	3.25
未发酵豆粕 2	2.98
未发酵豆粕 3	3.73

#### 4.4 调整粗灰分指标

参照GB/T 6438《饲料中粗灰分的测定》标准，由中国农业科学院饲料研究所中心实验室对来自13家企业的26个发酵豆粕进行了粗灰分含量的测定（表6）。26个发酵豆粕样品粗灰分含量为5.95~7.52%；平均含量6.69%；含量>7.5%的样品占3.85%（1/26）。

同时参考企业提供发酵豆粕粗蛋白含量测定结果：禾丰牧业股份有限公司检测发酵豆粕样品174个，粗灰分含量为5.72~9.20%，平均含量为6.71%；新希望六合股份有限公司检测发酵豆粕样品248个，粗灰分含量为5.96~10.32%，平均含量为6.53%；通威股份有限公司检测发酵豆粕样品106个，粗灰分含量为5.80~9.10%，平均含量为6.80%；青岛根源生物技术集团有限公司检测发酵豆粕样品1321个，粗灰分含量为5.49~7.26%，平均含量为6.52%；希杰（佛山）生物科技有限公司检测发酵豆粕样品11个，粗灰分含量为6.83~7.76%，平均含量为7.24%。

基于2017年11月25日、2019年1月12日和2019年12月8日三次发酵豆粕标准修标会议上专家和企业代表的建议进行粗灰分指标上浮。中国饲料成分及营养价值表（2018年29版）中国饲料库数据显示去皮大豆粕粗灰分4.93%，大豆粕粗灰分6.1%；GB/T《饲料原料 豆粕》中豆粕原料的粗灰分为≤7.00%；按照100斤豆粕约产88-89斤发酵豆粕，并结合企业样品实测结果，本修订标准初期规定：发酵豆粕产品粗灰分含量≤7.50%。

表 6 发酵豆粕样品粗灰分含量的测定

样品代号与来源	粗灰分，%
企业 1-1	6.64
企业 1-2	6.74
企业 2-1	6.6
企业 2-2	6.64
企业 3-1	6.5
企业 3-2	6.31
企业 3-3	5.95
企业 4-1	6.16
企业 4-2	6.7
企业 5-1	6.2
企业 5-2	6.68

企业 6-1	7.18
企业 6-2	6.76
企业 7-1	6.86
企业 7-2	6.72
企业 7-3	7.0
企业 8	7.52
企业 9-1	6.36
企业 9-2	6.56
企业 9-3	6.82
企业 10-1	6.84
企业 10-2	6.7
企业 11-1	7.26
企业 11-2	7.42
企业 12	6.52
企业 13	6.25
未发酵豆粕 1	6.04
未发酵豆粕 2	6.24
未发酵豆粕 3	5.82

#### 4.5 复核水分指标

参照GB/T6435《饲料中水分的测定》标准，由中国农业科学院饲料研究所中心实验室对来自13家企业的26个发酵豆粕进行了水分含量的测定（表7）。26个发酵豆粕样品的水分含量在5.39~13.94%之间，平均含量8.59%，含量大于12.0%的样品占3.85%（1/26）。

同时参考企业提供发酵豆粕水分含量测定结果：禾丰牧业股份有限公司检测发酵豆粕样品299个，水分含量为6.72~11.90%，平均含量为9.11%；新希望六合股份有限公司检测发酵豆粕样品258个，水分含量为5.07~11.81%，平均含量为9.32%；通威股份有限公司检测发酵豆粕样品105个，水分含量为6.70~12.10%，平均含量为9.50%；青岛根源生物技术集团有限公司检测发酵豆粕样品1308个，水分含量为6.92~11.91%，平均含量为8.90%。

结合企业样品实测结果，本修订标准初期规定：发酵豆粕产品水分含量 $\leq 12.00\%$ ，即继续保留原NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》中水分指标及其规定含量。

表 7 发酵豆粕样品水分含量的测定

样品代号与来源	水分，%
企业 1-1	7.12
企业 1-2	7.44
企业 2-1	9.16
企业 2-2	9.4
企业 3-1	8.62

企业 3-2	9.98
企业 3-3	11.31
企业 4-1	8.84
企业 4-2	5.39
企业 5-1	13.94
企业 5-2	9.24
企业 6-1	7.07
企业 6-2	8.62
企业 7-1	9.32
企业 7-2	9.58
企业 7-3	8.48
企业 8	6.94
企业 9-1	5.96
企业 9-2	11.38
企业 9-3	8.08
企业 10-1	7.18
企业 10-2	7.9
企业 11-1	6.6
企业 11-2	6.42
企业 12	7.94
企业 13	11.36
未发酵豆粕 1	11.82
未发酵豆粕 2	13.48
未发酵豆粕 3	12.42

#### 4.6 复核酸溶蛋白/总蛋白比例指标

酸溶蛋白这个指标用于检测发酵豆粕中小肽含量，具有成本低、易操作的优点，同时这个指标也能够间接反应抗原蛋白质的降解程度。中国农业科学院饲料研究所中心实验室参考GB/T 22492-2008《大豆肽粉》附录B中酸溶蛋白质含量的测定方法对26个发酵豆粕样品中的酸溶蛋白含量进行了检测。26个发酵豆粕样品酸溶蛋白含量为6.50~19.06%，平均含量为12.31%，含量低于8.0%样品占15.38%（4/26）。结合企业样品实测结果，本修订标准初期规定：发酵豆粕产品酸溶蛋白/总蛋白比例 $\geq$ 12.00%，即继续保留原NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》中酸溶蛋白/总蛋白比例。

表 8 发酵豆粕样品的酸溶蛋白/总蛋白比例的测定

样品代号与来源	酸溶蛋白/总蛋白比例，%
企业 1-1	19.06
企业 1-2	15.57
企业 2-1	12.89
企业 2-2	13.03

企业 3-1	12.88
企业 3-2	14.18
企业 3-3	10.70
企业 4-1	7.36
企业 4-2	10.03
企业 5-1	8.34
企业 5-2	10.98
企业 6-1	12.75
企业 6-2	17.36
企业 7-1	15.52
企业 7-2	16.73
企业 7-3	16.66
企业 8	6.50
企业 9-1	17.54
企业 9-2	8.20
企业 9-3	7.46
企业 10-1	11.91
企业 10-2	8.85
企业 11-1	11.14
企业 11-2	7.19
企业 12	18.16
企业 13	9.03
未发酵豆粕 1	3.76
未发酵豆粕 2	4.28
未发酵豆粕 3	3.69

#### 4.7 复核赖氨酸含量指标

参照GB/T18246《饲料中氨基酸的测定》等标准，由中国农业科学院饲料研究所中心实验室对来自13家企业的26个发酵豆粕进行了赖氨酸含量的测定（表9）。26个发酵豆粕样品赖氨酸含量为2.43~2.98%；平均含量为2.71%；低于2.5%的样品占7.69%（2/26）。

并结合企业样品实测结果，本修订标准初期规定：发酵豆粕产品赖氨酸含量 $\geq 2.50\%$ ，即继续保留原NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》中赖氨酸指标及其规定含量。

表9 发酵豆粕样品赖氨酸含量的测定

样品代号与来源	赖氨酸，%
企业 1-1	2.52
企业 1-2	2.6
企业 2-1	2.76
企业 2-2	2.71
企业 3-1	2.76
企业 3-2	2.77

企业 3-3	2.85
企业 4-1	2.8
企业 4-2	2.55
企业 5-1	2.58
企业 5-2	2.77
企业 6-1	2.58
企业 6-2	2.47
企业 7-1	2.65
企业 7-2	2.61
企业 7-3	2.74
企业 8	2.78
企业 9-1	2.43
企业 9-2	2.88
企业 9-3	2.86
企业 10-1	2.7
企业 10-2	2.71
企业 11-1	2.98
企业 11-2	2.6
企业 12	2.76
企业 13	2.76
未发酵豆粕 1	2.68
未发酵豆粕 2	2.81
未发酵豆粕 3	2.64

#### 4.8 增加氢氧化钾蛋白质溶解度指标

参照GB/T 19541《饲料原料 豆粕》附录A，由中国农业科学院饲料研究所中心实验室对来自13家企业的26个发酵豆粕进行了赖氨酸含量的测定（表10）。26个发酵豆粕样品氢氧化钾蛋白质溶解度为40.72~87.02%；平均含量为70.31%；低于60%的样品占11.54%（3/26）。

基于2017年11月25日及2019年12月8日两次发酵豆粕标准修标会议上专家和企业代表的建议增加了氢氧化钾蛋白质溶解度的指标。豆粕中粗蛋白在氢氧化钾溶液中的溶解度受加工程度的影响，豆粕国标《饲料原料 豆粕》GB/T 19541-2017中要求氢氧化钾溶解度为>73%。发酵豆粕为豆粕的再加工产品，本修订标准初期规定：发酵豆粕氢氧化钾蛋白质溶解度≥60.0%。

表 10 发酵豆粕样品氢氧化钾蛋白质溶解度的测定

样品代号与来源	氢氧化钾蛋白质溶解度，%
企业 1-1	61.0
企业 1-2	63.83
企业 2-1	76.83
企业 2-2	72.09
企业 3-1	73.98

企业 3-2	85.46
企业 3-3	65.87
企业 4-1	47.71
企业 4-2	41.96
企业 5-1	63.07
企业 5-2	67.49
企业 6-1	70.11
企业 6-2	75.17
企业 7-1	71.66
企业 7-2	87.02
企业 7-3	82.16
企业 8	40.72
企业 9-1	70.67
企业 9-2	83.36
企业 9-3	73.50
企业 10-1	72.91
企业 10-2	77.01
企业 11-1	81.06
企业 11-2	69.65
企业 12	81.78
企业 13	71.92
未发酵豆粕 1	79.69
未发酵豆粕 2	86.66
未发酵豆粕 3	83.33

#### 4.9 复核尿素酶活性指标

参照GB/T 8622《饲料用大豆制品中尿素酶活性的测定》方法，由中国农业科学院饲料研究所中心实验室对26个发酵豆粕样品的尿素酶活性进行了测定（表11），结果显示尿素酶活性为0~0.096U/g；平均值0.008U/g；全部样品活性均低于0.1U/g。根据2017年11月25日、2019年1月12日和2019年12月8日三次发酵豆粕标准修标会议上专家和企业代表的提出的建议，本修订标准初期规定：发酵豆粕产品尿素酶 $\leq 0.10$ U/g，即继续保留原NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》中尿素酶指标及其规定含量。

表 11 发酵豆粕尿素酶活性含量的测定

样品代号与来源	尿素酶活性, U/g
企业 1-1	0
企业 1-2	0.096
企业 2-1	0
企业 2-2	0
企业 3-1	0

企业 3-2	0.009
企业 3-3	0
企业 4-1	0
企业 4-2	0.029
企业 5-1	0
企业 5-2	0
企业 6-1	0
企业 6-2	0
企业 7-1	0
企业 7-2	0
企业 7-3	0.003
企业 8	0
企业 9-1	0
企业 9-2	0
企业 9-3	0
企业 10-1	0
企业 10-2	0
企业 11-1	0.046
企业 11-2	0.023
企业 12	0
企业 13	0.012
未发酵豆粕 1	0.002
未发酵豆粕 2	0.161
未发酵豆粕 3	0.031

#### 4.10 复核水苏糖含量指标

由中国农业科学院饲料研究所饲料加工室参考 NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》附录 A 发酵豆粕水苏糖测定方法对 26 个发酵豆粕样品中的水苏糖含量进行了检测。26 个发酵豆粕样品水苏糖含量为 0~3.67%，平均含量为 0.50%；含量大于 1.0%样品占 11.54%（3/26）。

对于液相色谱检查水苏糖含量的方法，在对企业的调研中有部分企业认为高效液相色谱仪价格昂贵，有些企业不具备检测条件，建议用薄层层析法进行水苏糖含量测定。虽然薄层层析法可以定性分析水苏糖，但是其作为半定量分析方法不能精准定量水苏糖含量。因此，本修订标准初期规定发酵豆粕产品水苏糖含量 $\leq 1.0\%$ ，即继续保留原 NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》中水苏糖指标含量规定及其测定方法。

表 12 发酵豆粕水苏糖含量测定

样品代号与来源	水苏糖，%
企业 1-1	3.67
企业 1-2	0.09



企业 2-1	0.41
企业 2-2	0
企业 3-1	0.42
企业 3-2	0.4
企业 3-3	0
企业 4-1	1.16
企业 4-2	0.55
企业 5-1	0
企业 5-2	0
企业 6-1	0.66
企业 6-2	0
企业 7-1	0.24
企业 7-2	0
企业 7-3	0.25
企业 8	0
企业 9-1	0.19
企业 9-2	1.16
企业 9-3	0.72
企业 10-1	0.62
企业 10-2	0.9
企业 11-1	0.4
企业 11-2	0.23
企业 12	0
企业 13	0.82
未发酵豆粕 1	2.36
未发酵豆粕 2	3.70
未发酵豆粕 3	3.83

#### 4.11 增加 $\beta$ -伴大豆球蛋白含量指标

在 2017 年 11 月 25 日和 2019 年 1 月 12 日两次发酵豆粕标准修标会议上, 有企业代表建议增加发酵豆粕抗原蛋白指标并以大豆球蛋白和 $\beta$ -伴大豆球蛋白指标为代表。在 2019 年 12 月 8 日的发酵豆粕标准预审会上专家鉴于大豆球蛋白和 $\beta$ -伴大豆球蛋白两个指标的平行性和企业检测减负的考虑, 选取 $\beta$ -伴大豆球蛋白指标为代表。

修标小组建立了检测 $\beta$ -伴大豆球蛋白的间接竞争酶联免疫法 (ELISA 法)。对来自 13 家企业的 26 个发酵豆粕进行了 $\beta$ -伴大豆球蛋白含量的测定 (表 13)。26 个发酵豆粕样品 $\beta$ -伴大豆球蛋白含量为 0-90.50mg/g, 平均值为 48.56mg/g; 其中 2 个样品含量>80mg/g, 占 7.69% (2/26)。

大豆 $\beta$ -伴大豆球蛋白约占大豆籽实总蛋白含量的25% (刘珊珊等, 2007), 以大豆经浸提和榨取后的副产品豆粕蛋白质含量达43%~45%计算 (刘宾等, 2010), 大豆球蛋白含量约 172~180mg/g, 大豆 $\beta$ -伴大豆球蛋白含量约占107.5~112.5mg/g。

基于本次修标中的测定结果显示未发酵豆粕 $\beta$ -伴大豆球蛋白的含量为 102.84~120.63mg/g, 平均值为 112.76mg/g, 本修订标准初期规定: 发酵豆粕 $\beta$ -伴大豆球蛋白的含量 $\leq$ 80mg/g (抗原蛋白降解率约达 30%)。

表 13 发酵豆粕样品的 $\beta$ -伴大豆球蛋白含量的测定

样品代号与来源	$\beta$ -伴大豆球蛋白, mg/g
企业 1-1	9.38
企业 1-2	9.24
企业 2-1	46.83
企业 2-2	53.53
企业 3-1	77.12
企业 3-2	84.91
企业 3-3	8.42
企业 4-1	43.84
企业 4-2	5.62
企业 5-1	11.75
企业 5-2	43.28
企业 6-1	90.50
企业 6-2	45.25
企业 7-1	58.16
企业 7-2	53.84
企业 7-3	57.63
企业 8	0
企业 9-1	40.32
企业 9-2	68.30
企业 9-3	72.20
企业 10-1	73.25
企业 10-2	74.99
企业 11-1	60.79
企业 11-2	41.91
企业 12	66.44
企业 13	64.98
未发酵豆粕 1	114.81
未发酵豆粕 2	120.63
未发酵豆粕 3	102.84

建立的发酵豆粕 $\beta$ -伴大豆球蛋白含量测定方法(列入附录B), 具体如下:

#### B.1 方法原理

采用间接竞争酶联免疫法(ELISA法)。在酶标板上预包被 $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原, 样品中的 $\beta$ -伴大豆球蛋白和预包被的抗原竞争 $\beta$ -伴大豆球蛋白抗体, 加入酶标二抗后, 用 TMB 底色显色, 样品吸光度值与其所含 $\beta$ -伴大豆球蛋白的含量呈负相关, 与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数即可得出样品中 $\beta$ -伴大豆球蛋白的含量。

## B.2 试剂

所用的水为 GB/T 6682 中规定的一级水。

### B.2.1 弗氏不完全佐剂

B.2.2 包被缓冲液(0.05 mol/L, pH 9.6 的碳酸缓冲液): 准确称取 1.59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 2.93 g  $\text{NaHCO}_3$ , 将其混溶于 1000 mL 蒸馏水中。

B.2.3 封闭液: 用包被缓冲液配制 5%的脱脂牛奶。

B.2.4 30×浓缩样品提取液: 181.7 g Tris、73 mL HCl和21 mLβ-巯基乙醇, 定容至1000 mL蒸馏水中。

B.2.5 样品稀释液: 0.9%氯化钠溶液。

B.2.6 抗体工作液: 5.0 g 牛血清白蛋白(BSA)、1.0 mL Proclin-300、100 mL 0.2 mol/L pH7.4 PBS、0.05 g 亮蓝、β-伴大豆球蛋白抗体1 mg。

B.2.7 洗液: 0.3 mol/L pH7.4 PBS溶液1000 mL加4% Tween-20。

B.2.8 酶标试剂: 10.0 g BSA、29.4 g 氯化钠、100 mL 小牛血清、1.0 mL Proclin-300、0.2 mol/L pH7.4 PBS 100 mL和0.5 mg 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体, 定容至1000 mL蒸馏水中。

B.2.9 显色液A: 40.0 g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、10.0 g 一水柠檬酸和0.5 g 过氧化氢脲, 定容至1000 mL。

B.2.10 显色液B: 2.0 g 一水合柠檬酸、150mL 无水甲醇、0.55 g 四甲基联苯胺(TMB)和100 mL N,N-二甲基甲酰胺, 定容至1000 mL蒸馏水中。

B.2.11 终止液: 2 mol/L 硫酸溶液。

B.2.12 标准系列溶液: 对照品1-6 (0  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2  $\mu\text{g/mL}$ 、0.4  $\mu\text{g/mL}$ 、1.6  $\mu\text{g/mL}$ 、6.4  $\mu\text{g/mL}$ 及 25.6  $\mu\text{g/mL}$ )

## B.3 仪器设备

B.3.1 实验室用样品粉碎机: 粉碎时应不产生强热。

B.3.2 样品筛: 孔径60目。

B.3.3 分析天平: 感量0.0001 g。

B.3.4 离心机: 转速 $\geq 4000$  r/min。

B.3.5 分光光度计

## B.4 分析

### B.4.1 β-伴大豆球蛋白多克隆抗体的制备

B.4.1.1 抗原制备: 将低温脱脂未变性的大豆粉以 1:10 的料水质量比分散于温度为 40-50 °C、pH 为 8.0-11.0(1 mol/L NaOH 调至)的水中, 除去非可溶性成分; 分散过程在机械搅拌或超声波处理的条件下处理 45 min; 调整溶液离子强度为 0.05-1.0, pH 为 5.0-6.0(35%HCl 调至), 在 4000-7000 r/min 离心, 得到的上清液用酸调 pH 至 4.0-5.0(35%HCl 调至), 然后在 2000-4000 r/min 离心, 得到的沉淀物为β-伴大豆球蛋白。

B.4.1.2 抗体制备: 适量弗氏不完全佐剂和纯化的β-伴大豆球蛋白混匀, 在旋涡振荡器上乳化。免疫两只新西兰白兔, 采用 6 wk 免疫程序。兔子先适应性喂养 1 wk。兔子免疫前先于一侧耳缘抽取 2 mL 静脉血, 4 °C 静置过夜, 取血清作阴性对照。对脊柱两侧进行多点背部皮下注射(剂量为 100  $\mu\text{g}$  免疫原/支); 初次免疫后第 15 d, 再用弗氏不完全佐剂抗原腹腔静脉加强免疫一次, 一周一次, 共 3 次。免疫后的第 25 d 和第 38 d 取血, 间接 ELISA 法测定抗体效价, Western blot 法观察免疫反应条带, 检测免疫效果。效价达到要求后, 用无佐剂抗原免疫 1 次, 免疫第 3 d 后颈动脉采血收集血清, 3000 r/min 离心 20 min。收获的抗血清用甘油 1:1 稀释, 于 -20 °C 保存。

### B.4.2 预包被抗原酶标板的制备

B.4.2.1 包被：用包被缓冲液将制备的 $\beta$ -伴大豆球蛋白稀释至最佳工作浓度，用移液枪准确移至酶标板，每个孔100  $\mu$ L，密封于4  $^{\circ}$ C过夜。

B.4.2.2 封闭：用洗液洗涤3次，每次90 s（简称洗涤，下同），然后拍干。每个孔加入200  $\mu$ L封闭液，37  $^{\circ}$ C温育1 h，洗涤1次，然后拍干，放入自封袋中，于4  $^{\circ}$ C干燥保存。

#### B.4.3 样品的制备

B.4.3.1 称样：将待测样品粉碎成60目以上颗粒，称取0.3000 g样品于50 mL离心管中；

B.4.3.2 提取：装有样品的50 mL离心管中再加入30 mL1 $\times$ 样品提取工作液，于25  $^{\circ}$ C震荡提取16 h；

B.4.3.3 离心：震荡后静置2 min，取上层液体于离心机中4000 r/min离心5 min；

B.4.3.4 稀释：取上清液用1 $\times$ 样品稀释工作液稀释70倍（为减小误差分两步稀释：先取上清100  $\mu$ L加600  $\mu$ L1 $\times$ 样品稀释工作液混匀，再取混合液100  $\mu$ L加900  $\mu$ L1 $\times$ 样品稀释工作液混匀），待测。

#### B.4.4 测定步骤

B.4.4.1 将所需试剂和酶标板从4  $^{\circ}$ C冰箱中取出，回温至20-25  $^{\circ}$ C，试剂使用前摇匀。

B.4.4.2 编号：将样品和校准品对应酶标板微孔按序编号，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。

B.4.4.3 加样：将6种校准品以及待测样品各取50  $\mu$ L加至对应的酶标板微孔中，再加入抗体工作液50  $\mu$ L/孔，轻轻震荡混匀。盖上盖板膜，37  $^{\circ}$ C避光反应30 min。

B.4.4.4 洗板：小心揭开盖板膜，倒掉微孔中液体，加入洗涤工作液300  $\mu$ L，浸泡10 s后倒掉，重复洗涤4次，于吸水纸上拍干。

B.4.4.5 加酶标试剂：加入酶标试剂100  $\mu$ L/孔，盖上盖板膜，37  $^{\circ}$ C，避光反应30 min，取出洗板。

B.4.4.6 显色：将等体积显色液A与显色液B混匀（显色液现用现混，5 min内用完，混匀时请勿剧烈震荡）；每孔加入混合液100  $\mu$ L，盖上盖板膜，37  $^{\circ}$ C，避光反应15 min。

B.4.4.7 终止：每孔加入终止液50  $\mu$ L，轻轻振荡混匀，立即于450/630 nm双波长下读取吸光度值。

### B.5 结果计算

#### B.5.1 百分吸光率计算

对照品或样品的百分吸光率等于对照品或样品的吸光度值的平均值（双孔）除以对照品1的吸光度值的平均值，再乘以100%。

#### B.5.2 标准曲线的绘制与计算

以校准品百分吸光率为纵坐标，以 $\beta$ -伴大豆球蛋白校准品浓度的对数为横坐标，绘制校准曲线图。将样品的百分吸光率代入校准曲线中，从校准曲线上读出样品所对应的浓度，乘以其对应的稀释系数即为样品中 $\beta$ -伴大豆球蛋白的实际浓度。

### B.6 精密度

样品线性回归于预期浓度相关系数 $\geq 0.98$ ，批内变异系数 $\leq 10\%$ ，批间变异系数 $\leq 15\%$ 。

建立的发酵豆粕 $\beta$ -伴大豆球蛋白含量测定方法经中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所及生物工程国家重点实验室（中国科学院过程工程研究所）等三家验证单位验证检测。三家验证单位验证结果表明，批内吸光度值变异系数 $<$

7.10%，标准曲线相关系数可达0.98以上，方法准确度（回收率）符合GB/T 27404-2008 和GB/T 27417-2017的要求，方法精密度符合标准附录B发酵豆粕β-伴大豆球蛋白含量测定中精密度要求。该方法在实验室间有较好的稳定性与重现性，可以满足发酵豆粕中β-伴大豆球蛋白定量检测的技术要求。

#### 4.12 增加挥发性盐基氮含量指标

在NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》制定过程中曾考虑到挥发性盐基氮指标，当时认为挥发性盐基氮是一个两难的发酵过程指标，挥发性盐基氮是动物性食品由于酶和细菌的作用，在腐败过程中，使蛋白质分解而产生氨以及胺类等碱性含氮物质，其源自于衡量肉类食品新鲜度的化学指标，借以反应发酵豆粕的发酵度，其阈值过高是过度发酵的表现，过低是发酵不够的表现。同时，葛向阳等（2010）认为“发酵豆粕中挥发性盐基氮的产生主要是由于发酵温度过高，氧气供给不足，蛋白质分解过度而产生氨。挥发性盐基氮过高往往导致发酵适口性变差，严重时会导致动物中毒”。在固态发酵多样性的前提下，无法界定其科学的或者合适的范围，暂时难以发挥指导性的产品质量规范作用，所以在NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》中没有挥发性盐基氮指标，认为其不具备作为产品质量项目的成熟条件。

根据2017年11月25日、2019年1月12日和2019年12月8日三次发酵豆粕标准修标会议上有企业代表建议增加挥发性盐基氮含量这一指标。主要鉴于目前发酵豆粕行业中非豆粕蛋白源的添加影响发酵豆粕品质。目前涉及挥发性盐基氮的测定标准有2个：GB 5009.228-2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》和GB/T 32141-2015《饲料中挥发性盐基氮的测定》。本修订标准挥发性盐基氮测定方法参考GB 5009.228-2016《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》中第二法自动凯氏定氮仪法测定

由中国农业科学院饲料研究所饲料中心实验室对26个发酵豆粕样品中的挥发性盐基氮含量进行了检测（表14）。26个发酵豆粕样品挥发性盐基氮含量为27.12~171.0 mgN/100g，平均含量为55.65 mgN/100g，挥发性盐基氮含量大于75.0mg N/100g的样品占7.69%（2/26）。本修订标准初期规定发酵豆粕产品挥发性盐基氮含量≤75.0 mgN/100g。

基于发酵不当、动物厨房及非烘干产品三个方面考虑。本指标原引动物性食品的指标间接反映豆粕不良发酵的副产物含量，类似于鱼粉的腐败变质。通过检测发现这个指标有超标现象，为了节省成本，市场上开始出现未烘干的发酵豆粕产品，对此类产品的保质期相当短促应予以关注，与此，考虑到动物厨房已成为发酵原料发展的新趋势。

表 14 发酵豆粕样品的挥发性盐基氮测定

样品代号与来源	挥发性盐基氮, mgN/100g
企业 1-1	40.59
企业 1-2	63.66
企业 2-1	36.95
企业 2-2	45.92
企业 3-1	56.97
企业 3-2	50.16
企业 3-3	45.63
企业 4-1	91.18
企业 4-2	57.62
企业 5-1	27.12
企业 5-2	49.71
企业 6-1	62.26
企业 6-2	50.59
企业 7-1	171.0
企业 7-2	43.83
企业 7-3	60.3
企业 8	45.69
企业 9-1	44.33
企业 9-2	50.01
企业 9-3	48.56
企业 10-1	48.12
企业 10-2	47.63
企业 11-1	48.86
企业 11-2	44.04
企业 12	61.14
企业 13	55.05
未发酵豆粕 1	45.64
未发酵豆粕 2	47.86
未发酵豆粕 3	44.68

#### 4.13 修改了卫生指标

根据 2019 年 1 月 12 日发酵豆粕标准修标会议上与会专家和企业代表的建议, 发酵豆粕卫生指标按照 GB13078-2017 饲料卫生标准执行 (表 15)。

表 15 发酵豆粕卫生指标规定

项目		GB 13078 饲料卫生标准中具体指标规定
无机污染物	总砷, mg/kg	≤2
	铅, mg/kg	≤10
	汞, mg/kg	≤0.1

	镉, mg/kg	≤1
	氟, mg/kg	≤150
	亚硝酸盐 (以 NaNO <sub>2</sub> 计), mg/kg	≤15
真菌毒素	黄曲霉素 B <sub>1</sub> , μg/kg	≤30
	玉米赤霉烯酮, mg/kg	≤1
	脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (呕吐毒素), mg/kg	≤5
	T-2 毒素, mg/kg	≤0.5
天然植物毒素	氰化物 (以 HCN 计), mg/kg	≤50
	游离棉酚, mg/kg	≤20
	异硫氰酸酯 (以丙烯基异硫氰酸酯计), mg/kg	≤100
有机氯污染	多氯联苯 (PCB, 一 PCB28、PCB52、PCB101、PCB138、PCB153、PCB180 之和), μg/kg	≤10
	六六六 (HCH, 以 α-HCH, β-HCH, γ-HCH 之和计), mg/kg	≤0.2
	滴滴涕 (以 p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDT 之和计), mg/kg	≤0.05
	六氯苯, mg/kg	≤0.01
微生物污染物	沙门氏菌	不得检出

## 5 补充型式检验规定

补充“出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时”。

## 6 修改保存条件

“产品应贮存于阴凉、干燥处, 防潮、防霉变、防虫蛀, 严禁与有毒、有害和有其它污染的物品一起混合贮存。”修改为“常温保存, 产品应贮存于干燥处, 防潮、防霉变、防虫蛀, 严禁与有毒、有害和有其它污染的物品一起混合贮存。”。

## 7 修改保质期

“180天。”修改为“在规定的贮存条件下, 保质期为180天。”。

## 8 饲料用发酵豆粕的质量等级指标和卫生指标汇总

综上所述, 饲料用发酵豆粕的 11 个候选技术指标检测结果汇总见表 16。

表 16 饲料用发酵豆粕产品的标准候选技术指标汇总

项目	等级指标	
	一级	二级

粗蛋白质，%	≥50.0	≥45.0
粗纤维，%	≤7.0	
粗灰分，%	≤7.50	
水分，%	≤12.0	
酸溶蛋白（占粗蛋白比例），%	≥8.0	
赖氨酸，%	≥2.50	
氢氧化钾蛋白溶解度，%	≥60.0	
尿素酶，U/g	≤0.1	
水苏糖，%	≤1.0	
β-伴大豆球蛋白，mg/g	≤80.0	
挥发性盐基氮，mgN/100g	≤75.0	

#### 四、采用国际标准

NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》为国内外首个发酵豆粕标准，本修订标准为对其首次修订。

#### 五、与现行法律法规和强制性标准的关系

本修订标准与有关的现行法律法规和强制性标准没有冲突和重复，支撑《饲料原料目录》（农业部公告 1773 号）中规定的强制性标识要求”的执行。

本标准的修订将会为推动行业发展，并合理利用豆粕资源，通过产品标准规范市场，引导企业良性竞争，提质增效豆粕，有效缓解我国优质饲料蛋白短缺的压力，保障行业稳健发展。

#### 六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准的修订广泛征求意见，包括大学、科研院所、企业及国家/部级饲料质量检测中心，根据反馈意见对标准进行了修改，无重大分歧意见。

(1) 基于2017年11月25日和2019年1月12日两次会议（31家单位的69位同行专家的2天讨论论证、5500字会议纪要）、8家企业调研、10家企业标准、文献参考以及12个指标的测定形成《饲料原料 发酵豆粕》标准修标草案及编制说明草案。



(2) 从2019年8月28日至2019年10月17日进行征求意见，共收到16个省26家单位的38位同行专家（包括12家大学与科研院所、2家国家或者部级饲料质量检测中心和12家公司）的意见，未见重大分歧意见。

(3) 2019年12月8日在北京，制标单位中国农业科学院饲料研究所组织专家对农业行业标准《饲料原料 发酵豆粕》（征求意见稿）进行会议审查。与会7位专家认为：标准数据可靠，标准预审稿可行。专家组提出进一步修改意见8条，未见重大分歧意见。

## 七、标准作为强制性或推荐性标准的意见

本标准修订后建议作为推荐性标准发布。

## 八、贯彻标准的要求和措施建议

为贯彻实施本标准，建议相关职能部门指导和指定相关科研机构对相关技术人员进行培训。

## 九、废止现行有关标准的建议

本修订标准发布实施后替代 NY/T 2218-2012《饲料原料 发酵豆粕》。

## 十、其他应予说明的事项

无。

### 注明（特别致谢）：

1. 除以下列出的参考文献外，本标准在修订过程中通过发函索取方式先后有20家含有发酵豆粕生产经营业务的公司慷慨提供的发酵豆粕产品样品或其产品企业标准或参加了2017年11月25日、2019年1月12日和2019年12月8日的修标主要指标的会议讨论与发言，专此一一致谢。这些公司是（按照公司名称的汉语拼音排名）：安徽天邦生物技术有限公司、安佑生物科技集团股份有限公司、东莞市银华生物科技有限公司、福建龙岩闽雄生物科技股份有限公司、广东金肽阳生物科技有限公司、湖北邦之德牧业科技有限公司、广东希普生物科技股份有限公司、迈安德集团有限公司、山东和实集团有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、青岛蔚蓝生物集团有限公司、全能生物科技（天津）有限公司、上海源耀生物股份有限公司、深圳金新农科

技股份有限公司、武汉金泰得生物科技有限公司、希杰（上海）商贸有限公司、益海嘉里投资有限公司、浙江博仕佳生物科技有限公司、浙江科峰生物技术有限公司和正大集团。

2. 考虑到实测样品各种指标数值有高低不同、且样品为各企业自己制备和免费赠送给修标单位仅限于检测参考之用，因此我们将所有样品提供企业信息一律用代号表示。

### 主要参考文献

1. GB 13078-2017 饲料卫生标准
2. GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定
3. GB/T 19541-2017 饲料原料 豆粕
4. GB/T 22492-2008 大豆肽粉
5. GB/T 2712-2014 食品安全国家标准 豆制品
6. GB/T 32141-2015 饲料中挥发性盐基氮的测定
7. GB 5009.228-2016 食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定
8. GB/T 6432-2018 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法
9. GB/T 6434-2006 饲料中粗纤维的含量测定 过滤法
10. GB/T 6435-2014 饲料中水分的测定
11. GB/T 6438-2007 饲料中粗灰分的测定
12. GB/T 8622 饲料用大豆制品中尿素酶活性的测定
13. NY/T 1444-2007 微生物饲料添加剂技术通则
14. NY/T 2218-2012 饲料原料 发酵豆粕
15. Cervantes-Pahm SK, Stein HH. Ileal digestibility of amino acids in conventional, fermented, and enzyme-treated soybean meal and in soy protein isolate, fish meal, and casein fed to weanling pigs. *J Anim Sci.* 2010, 88:2674-2683.
16. 葛向阳. 发酵豆粕评判标准、测定程序和鉴别方法. *饲料与畜牧.* 2010(2): 16-17.
17. 柯祥军,瞿明仁,易中华. 不同比例发酵豆粕对肉鸡生产性能及营养素表观消化率的影响. *饲料广角.* 2008, (3):31-34.
18. 李建. 发酵豆粕研究进展. *粮食与饲料工业.* 2009(6):31-35.
19. 刘宾,滕达,王建华.大豆主要致敏蛋白生化特性的研究进展. *中国饲料.* 2010, (20):12-15.
20. 刘珊珊,武小霞,姜振峰,李文滨. 大豆 7S 球蛋白 $\beta$ -伴大豆球蛋白的研究现状. *大豆科学.* 2007,26(3):417-422.
21. 刘欣,冯杰,刘媛媛,卢亚萍. *Aspergillus oryzae* 发酵豆粕对肉仔鸡生长性能及免疫功能的影响, *中国畜牧杂志.* 2007,43(9):25-27.
22. 肖蒙. 我国发酵豆粕市场供需特点分析及展望. *饲料工业.* 2017,38(18):61-64.
23. 徐欢根. 发酵豆粕质量检测初探. *饲料研究.* 2007(12): 26-27.
24. 杨耐德,符广才.凡纳滨对虾饲料中发酵豆粕替代鱼粉的研究. *饲料工业.* 2008(29):24-26.
25. 章世元,全丽萍,徐健超,俞路,张杰,王俊丽,陈文静. 发酵豆粕对断奶仔猪生长性能、养分消化率和胃肠道发育的影响. *中国饲料.* 2008(16):8-11.
26. 杨玉娟,姚怡莎,秦玉昌,邱静,李军国,李俊,谷旭. 豆粕与发酵豆粕中主要抗营养因子调查分

析. 中国农业科学. 2016,49(3):573-580.