



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 43745—2024

## 饲料原料 发酵豆粕

Feed material—Fermented soybean meal



2024-03-15 发布

2024-10-01 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会



# 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专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院饲料研究所、湖北邦之德牧业科技有限公司。

本文件主要起草人：王建华、滕达、吴晓峰、毛若雨、郝娅、杨娜。





# 饲料原料 发酵豆粕

## 1 范围

本文件规定了饲料原料发酵豆粕的技术要求、取样、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期，描述了相应的试验方法。

本文件适用于以豆粕为主要原料(≥95%)，使用农业农村部《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 5009.228—2016 食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定  
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 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 20195 动物饲料 试样的制备  
GB/T 22492—2008 大豆肽粉

## 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

相关要求见《饲料原料目录》。

### 4.2 外观与性状

浅黄色到棕色粉状物或颗粒物，色泽均匀，无结块；无异物，无虫蛀；具有发酵的特殊味道，无异味。

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/%	≤	7.5	
水分/%	≤	12.0	
酸溶蛋白(占粗蛋白质比例)/%	≥	8.0	
赖氨酸/%	≥	2.5	
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(以 N 计)/(mg/100 g)	≤	80.0	

4.4 卫生指标

应符合 GB 13078 的要求。

5 取样

按 GB/T 14699.1 的规定执行。

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 的规定执行。

6.3 粗纤维

按 GB/T 6434 的规定执行。

6.4 粗灰分

按 GB/T 6438 的规定执行。



6.5 水分

按 GB/T 6435 的规定执行。

6.6 酸溶蛋白

按 GB/T 22492—2008 附录 B 中 B.4.1 的规定执行。

6.7 赖氨酸

按 GB/T 18246 的规定执行。

6.8 尿素酶

按 GB/T 8622 的规定执行。

6.9 水苏糖

按附录 A 的规定执行。

6.10  $\beta$ -伴大豆球蛋白

按附录 B 的规定执行。

6.11 挥发性盐基氮

按 GB 5009.228—2016 中第二法自动凯氏定氮仪法执行,在 10.3 步骤之前样品需过滤或离心,取清液。

6.12 卫生指标

按 GB 13078 的规定执行。

7 检验规则

7.1 组批

以同一批原料、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,但每批产品不应超过 100 t。



7.2 出厂检验

所列项目中,外观与性状、粗蛋白质、水分、酸溶蛋白、尿素酶为出厂检验项目。

7.3 型式检验

型式检验项目为 4.2~4.4 规定的项目。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,也应进行型式检验:

- 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。微生物指标不应复检。
- 7.4.3 检验结果判定的允许误差按 GB/T 18823 的规定执行。
- 7.4.4 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。

8 标签、包装、运输、贮存和保质期

8.1 标签

按 GB 10648 的规定执行。

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,不应与有毒有害物质共运。

8.4 贮存

贮存时防止日晒、雨淋,不应与有毒有害物质混贮。

8.5 保质期

未开启包装的产品,在规定的运输、贮存条件下,产品保质期应与标签中标明的保质期一致。





附 录 A  
(规范性)  
发酵豆粕中水苏糖含量测定方法

A.1 原理

用水提取试样中的水苏糖,然后采用高效液相色谱法(HPLC)测定其含量。

A.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

A.2.1 水:GB/T 6682 一级。

A.2.2 乙腈:色谱纯。

A.2.3 三氯乙酸。

A.2.4 水苏糖标准储备溶液(10 mg/mL):精确称取水苏糖 0.500 0 g,用水溶解并定容至 50 mL。临用现配。

A.2.5 水苏糖标准系列溶液:分别取水苏糖标准储备溶液(A.2.4)25  $\mu$ L、50  $\mu$ L、75  $\mu$ L、100  $\mu$ L、125  $\mu$ L、150  $\mu$ L,于 HPLC 进样瓶中,分别加水至 1.00 mL,制成质量浓度分别为 0.25 mg/mL、0.50 mg/mL、0.75 mg/mL、1.00 mg/mL、1.25 mg/mL 和 1.50 mg/mL 的标准系列溶液。

A.3 仪器设备

A.3.1 高效液相色谱仪:示差折光检测器。

A.3.2 分析天平:感量 0.000 1 g。

A.3.3 超声波清洗仪。

A.3.4 离心机:转速不低于 12 000 r/min。

A.3.5 滤膜:水系(0.22  $\mu$ m)。

A.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品,粉碎过筛(孔径 0.25 mm),备用。

A.5 试验步骤

A.5.1 试样溶液的制备

精确称取发酵豆粕样品 2 g(精确至 0.000 1 g),加 20 mL 水,于超声波清洗仪中,超声提取 15 min,将浸提液于 70  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,加入 0.5 g 三氯乙酸,混匀后,置冰浴中 2 h,在 12 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,样品制备后立即测定。

A.5.2 色谱参考条件

色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:氨丙基键合固定相柱,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;
- b) 柱温:30  $^{\circ}$ C;
- c) 流动相:乙腈-水(75+25);

- d) 流速:1.0 mL/min;
- e) 进样量:10 μL。

A.5.3 测定

在仪器最佳状态下分别测定水苏糖标准系列溶液和试样溶液(A.5.1)中的水苏糖含量。试样溶液重复测定 2 次。以色谱峰面积为纵坐标、标准溶液浓度为横坐标绘制标准曲线。根据试样溶液色谱峰面积对照水苏糖的标准曲线计算样品浓度。

A.6 试验数据处理

试样中水苏糖的含量  $w$  表示为试样中的质量分数,以%计,按式(A.1)计算:

$$w = \frac{\rho \times V}{m \times 1\,000} \times 100 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

- $\rho$  ——标准曲线上查得试样溶液中水苏糖的质量浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);
- $V$  ——试样溶液的体积,单位为毫升(mL);
- $m$  ——试样的质量,单位为克(g);
- 1 000 ——换算系数。

A.7 精密度

在重复性条件下,2 次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 2%。



附 录 B  
(规范性)

发酵豆粕中  $\beta$ -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  $\beta$ -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,用四甲基联苯胺(TMB)底色液显色,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 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

B.2.1 水:所用的水为 GB/T 6682 中规定的二级水。

B.2.2 弗氏不完全佐剂。

B.2.3 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 碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )和 2.93 g 碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ ),将其混溶于 1 000 mL 蒸馏水中。

B.2.4 封闭液:用包被缓冲液配制 5% 的脱脂牛奶。

B.2.5 30×浓缩样品提取液:181.7 g Tris、73 mL 盐酸(HCl)和 21 mL  $\beta$ -巯基乙醇,定容至 1 000 mL 蒸馏水中。

B.2.6 样品稀释液:0.9%氯化钠溶液。

B.2.7 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 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)、0.05 g 亮蓝、 $\beta$ -伴大豆球蛋白抗体 1 mg。

B.2.8 洗液:0.3 mol/L pH 7.4 PBS 1 000 mL 加 4%吐温-20。

B.2.9 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 pH 7.4 PBS 100 mL 和 0.5 mg 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体,定容至 1 000 mL 蒸馏水中。

B.2.10 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 1 000 mL。

B.2.11 显色液 B:2.0 g 一水合柠檬酸、150 mL 无水甲醇、0.55 g TMB 和 100 mL N,N-二甲基甲酰胺,定容至 1 000 mL 蒸馏水中。

B.2.12 终止液:2 mol/L 硫酸溶液。

B.2.13 标准系列溶液: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  $\mu\text{g/mL}$ 、25.6  $\mu\text{g/mL}$   $\beta$ -伴大豆球蛋白。

B.3 仪器设备

B.3.1 分析天平:感量 0.000 1 g。

B.3.2 离心机:转速 $\geq 4\,000$  r/min。

B.3.3 分光光度计。

B.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品,粉碎过筛(孔径 0.25 mm),备用。



## B.5 实验步骤

### B.5.1 $\beta$ -伴大豆球蛋白多克隆抗体的制备

**B.5.1.1 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 °C ~ 50 °C、pH 8.0 ~ 11.0 [1 mol/L 氢氧化钠 (NaOH) 调制] 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 5.0 ~ 6.0 (35% HCl 调制), 在 4 000 r/min ~ 7 000 r/min 离心, 得到的上清液用酸调 pH 至 4.0 ~ 5.0 (35% HCl 调制), 然后在 2 000 r/min ~ 4 000 r/min 离心, 得到的沉淀物为  $\beta$ -伴大豆球蛋白。

**B.5.1.2 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 2 只新西兰白兔, 采用 6 周免疫程序。兔子先适应性喂养 1 周。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 (剂量为每只 100  $\mu$ g 免疫原); 初次免疫后第 15 天, 再用弗氏不完全佐剂抗原腹腔静脉加强免疫 1 次, 1 周 1 次, 共 3 次。免疫后的第 25 天和第 38 天取血, 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 天后颈动脉采血收集血清, 3 000 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.5.2 预包被抗原酶标板的制备

**B.5.2.1 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.5.2.2 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.5.3 样品的制备

**B.5.3.1 称样:**称取 0.300 0 g 样品于 50 mL 离心管中。

**B.5.3.2 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 振荡提取 16 h。

**B.5.3.3 离心:**振荡后静置 2 min, 取上层液体于离心机中 4 000 r/min 离心 5 min。

**B.5.3.4 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.5.4 测定步骤

**B.5.4.1** 将所需试剂和酶标板从 4 °C 冰箱中取出, 回温至 20 °C ~ 25 °C, 试剂使用前摇匀。

**B.5.4.2 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.5.4.3 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, 轻轻振荡混匀。盖上盖板膜, 37 °C 避光反应 30 min。

**B.5.4.4 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.5.4.5 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.5.4.6 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, 混匀时请勿剧烈振荡); 每孔加入混合液 100  $\mu$ L, 盖上盖板膜, 37 °C, 避光反应 15 min。

**B.5.4.7 终止:**每孔加入终止液 50  $\mu$ L, 轻轻振荡混匀, 立即于 450 nm/630 nm 双波长下读取吸光度值。

**B.6 试验数据处理**

**B.6.1 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.6.2 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.7 精密度**

在重复性条件下,2 次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 12%。

参 考 文 献

[1] 饲料添加剂品种目录. 中华人民共和国农业农村部. 2023.  
[2] 饲料原料目录. 中华人民共和国农业农村部. 2023.

---





