团体标准

《蛋白饲料原料中相对分子量小于1000u以下的蛋白质水解物所占比例的测定》

**（征求意见稿）**

**编制说明**

湛江银恒生物工程有限公司

2018年8月23日

一、标准制定背景及任务来源

**1.1 任务来源**

本标准的制定任务来源于湛江市海洋创新示范市项目“南极磷虾发酵制备

绿色促生长饲料添加剂的关键技术研究及产业化”。根据该项目的任务要求及产品的技术指标，于2021年7月1日向湛江市标准化协会申请制定“饲料原料中低聚肽的测定”团体标准。参考低聚肽测定的的相关文献，结合发酵蛋白饲料中低聚肽指标在饲料工业中的实际应用及其检测实践制定。

**1.2 标准起草单位**

本标准由湛江银恒生物工程有限公司、湛江市标准化协会、广东海洋大学联合起草。

**1.3 标准制定的意义**

**1.3.1 低聚肽的定义及其功能特性**

肽是2个或超过2个的氨基酸以肽键相连的化合物。相对分子质量段在5000以下的称为肽，在5000～1000之间的称为大肽，而相对分子质量在1000以下的肽称为低聚肽，俗称小肽。目前《海洋鱼低聚肽粉》、《小麦低聚肽粉》和《玉米低聚肽粉》等标准均把分子量小于1000u的肽称为低聚肽。

低聚肽可被直接吸收利用，且低聚肽的吸收具有耗能低、转运速度快、载体不易饱和等优点。相对于普通的多肽，低聚肽的抗氧化、免疫增强等功能特性更为突出，在动物的生长发育及免疫等方面起着举足轻重的作用。国内外大量的研究表明，低聚肽可以提高动物的生产性能及增强动物的免疫力。因而，低聚肽在饲料工业备受关注。

**1.3.2低聚肽的制备方法**

在当前的生产工艺下，低聚肽就是通过化学或生物方法将大分子蛋白原料分解制备而成。现在生产低聚肽方法主要有化学法、酶解法和微生物发酵法三条途径。化学法通过强酸或强碱的作用分解大分子蛋白为小分子肽，由于强酸、强碱具有腐蚀性，该法会带来大量的污染。酶解法利用外加蛋白酶的定向分解的特性将大分子蛋白分解为小分子肽。微生物发酵法是利用微生物发酵过程产生的蛋白酶将蛋白转化为肽。目前，市场上低聚肽产品绝大多数以大分子蛋白为原料，通过酶解法或发酵法制备而成。

**1.3.3 发酵、酶解蛋白饲料市场情况介绍**

目前以发酵豆粕为代表的采用微生物发酵技术或酶解技术生产的优质蛋白原料在饲料工业得到了广泛的应用，在水产、肉鸡、仔猪等的饲喂中表现出了良好的效果。大分子饲料蛋白在发酵或酶解过程中分解成肽，甚至可产生部分低聚肽。因此目前在我国广泛应用的发酵、酶解蛋白饲料中含有一定的低聚肽。

目前我国发酵蛋白饲料市场需求量增长很快，其中商品化的发酵豆粕年消费量在50万吨左右，对于发酵豆粕的市场情况，《我国发酵豆粕市场供需特点分析及展望》一文做了详细的介绍。

从市场调研和企业标准信息公共服务平台查询可知，目前从事发酵和酶解类蛋白饲料原料生产的企业主要有上海源耀生物科技有限公司、日照东维饲料有限公司、泰安生力源生物工程有限公司、青岛根源生物技术集团有限公司、东莞银华等几十家企业，年销售量50余万吨。

**1.3.4发酵、酶解蛋白饲料产品中酸溶性蛋白的测定**

酸溶性蛋白是指在一定浓度三氯乙酸溶液中可溶解的粗蛋白质。大分子的蛋白质在三氯乙酸溶液中沉淀，而小分子肽类和游离氨基酸可溶解于三氯乙酸溶液。通过三氯乙酸溶液沉淀可将大分子蛋白质与小分子肽类区分开来。日本将三氯乙酸可溶蛋白做为大豆肽的常规检测方法。大豆肽粉行业标准中酸溶蛋白质的测定方法就是将肽粉经酸沉处理后用国家标准（GB14771-1993）的方法测定酸溶蛋白，游离氨基酸含量测定方法采用GB/T14965食物中氨基酸的测定方法，酸溶蛋白质含量减游离氨基酸含量即为大豆肽含量。

酸溶蛋白是评价发酵、酶解粕类蛋白质品质的重要技术指标。发酵豆粕发布了产品标准《饲料原料发酵豆粕》（NY/T 2218-2012）。该标准中把酸溶性蛋白含量（占总蛋白）作为其产品的基本技术指标。2013年1月1日起正式实施的《饲料原料目录》规定了不同饲料原料的“强制性标识要求”，其中就包含对发酵、酶解粕类和蛋白原料中酸溶蛋白的相关要求。使用酸溶蛋白含量指标评价发酵、酶解粕类蛋白质品质，既可以反映其中抗原蛋白质和其他蛋白质抗营养因子被水解的程度，进而揭示该类抗营养因子活性被消除的程度，又可一定程度上反映肽含量的高低。

**1.3.5 本标准制定的意义**

近年来，随着发酵蛋白饲料技术的进步，发酵、酶解粕类蛋白质产品中酸溶性蛋白含量不断提高。例如，很多厂家将发酵豆粕的酸溶性蛋白含量企业标准制定为25%以上，这远高于《饲料原料发酵豆粕》（NY/T 2218-2012）中的8%。**发酵、酶解粕类蛋白质的目的从最早的去除抗营养因子和提高消化吸收性能升级为制备富含功能性肽的功能性饲料蛋白**。而传统的酸溶性蛋白显然达不到这一要求，因为酸溶性蛋白含有大量的大肽（分子量大于1000u）,而功能性肽多为低聚肽（分子量小于1000u）。因此，测定发酵、酶解粕类蛋白质产品中分子量小于1000u的蛋白质水解物的比例更能精准地反应该类产品的功能特性。

**二、主要工作过程**

**2.1 成立标准编制小组**

湛江银恒生物工程有限公承担了湛江市海洋创新示范市项目“南极磷虾发酵制备绿色促生长饲料添加剂的关键技术研究及产业化”。该项目研发的产品的酸溶性蛋白含量高达50%，为了进一步体现产品的功效，决定进一步测定该产品的低聚肽含量，决定和湛江市标准化协会、广东海洋大学联合制定《饲料原料中低聚肽的测定》团体标准，并于2020年10月正式成立标准编制小组，确定了总体工作方案。

表1标准编制工作组人员组成及分工

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 成员 | 姓名 | 性别 | 所学专业 | 工作单位 | 职称/职务 | 承担任务 |
| 刘唤明 | 男 | 发酵工程 | 广东海洋大学 | 副教授 | 总体负责 |
| 陈东明 | 男 | 反刍动物营养 | 湛江银恒生物工程有限工程 | 董事长 | 协助标准起草 |
| 郑赫祎 | 女 | 分析测试 | 湛江银恒生物工程有限工程 | 化验员 | 检测技术研究 |
| 付光中 | 男 | 食品科学 | 湛江市标准化协会 | 高级工程师 | 协助标准起草 |
| 叶梓颖 | 女 | 工商管理 | 湛江市标准化协会 | 助理工程师 | 协助标准起草 |

**2.2 查询相关标准和文献资料**

2020年10月～12月，本标准编制组成员查询和收集了相关标准和文献资料（详细信息见参考文献），了解发酵、酶解蛋白饲料相关的标准现状，技术成熟情况等，确立了标准制订的指导思想。

**2.3 产品调研阶段**

2021年1月～2021年2月，调研了湛江恒兴饲料股份有限公司和广东粤海饲料集团股份有限公司有关发酵、酶解蛋白饲料的使用情况，并收集了国内多家企业生产的发酵、酶解蛋白饲料。

**2.4 确定标准制定工作的任务分工和时间安排**

2021年3月，在前期查询资料文献和实际调研考察的基础上，标准编制组确定了建立标准分析方法的技术路线和技术难点，以及拟开展的主要工作等内容，制定工作进度表。

表2工作进度表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **时间** | **主要内容** | **参与人员** |
| 2020.10 | 成立标准编制小组 | 刘唤明、陈东明、郑赫祎、付光中、叶梓颖 |
| 2020.10-2020.12 | 查询国内外相关标准和文献资料 | 刘唤明 |
| 2021.01-2021.03 | 实地调研生产企业 | 刘唤明、付光中 |
| 2021.04-2021.05 | 确定标准制定工作的任务分工和时间安排 | 刘唤明、陈东明 |
| 2021.06-2021.08 | 确定方法的主要试验技术内容 | 郑赫祎 |
| 2021.09 | 编写编制说明 | 刘唤明 |
| 2021.09 | 编写标准文本 | 刘唤明 |
| 2021.09 | 内部修改、审查编制说明和标准文本 | 刘唤明、付光中、叶梓颖 |
| 2021.11 | 形成草案、进行征求意见 | 刘唤明、付光中、叶梓颖 |
| 2021.12 | 对征求意见进行整理修改 | 刘唤明、陈东明 |
| 2021.12 | 形成预审会文本 | 刘唤明、陈东明 |

**三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据**

**3.1 标准编制原则**

在编制过程中，起草单位查阅了有关文献资料，参考了行业部门制定的相关标准方法。

参考标准：农业行业标准NY/T 3801-2020《饲料原料中酸溶蛋白的测定》、国家标准GB/T 22729-2008《海洋鱼低聚肽粉》、轻工行业标准QB/T5298-2018《小麦低聚肽粉》、轻工行业标准QB/T4707-2014《玉米低聚肽粉》、农业行业标准NY/T2218-2012《饲料原料发酵豆粕》和国家标准GB/T 6432-2018《饲料中粗蛋白的测定凯氏定氮法》等。

**3.2 主要技术内容**

**3.2.1 低聚肽定义的确定**

在国家标准GB/T22729-2008《海洋鱼低聚肽粉》中，将海洋鱼低聚肽粉定义为：以海洋鱼皮、鱼骨或鱼肉为原料，用酶解法生产的、相对分子质量低于1000 u的低聚肽（短肽）为主要成分的粉末状产品。且该标准还规定了相对分子质量低于1000 u的蛋白质水解物所占比例≥85%。

在轻工行业标准QB/T5298-2018《小麦低聚肽粉》中，将小麦低聚肽粉定义为：以谷阮粉（小麦蛋白粉）为原料，用酶（蛋白酶）解法生产的，以相对分子质量小于1000u的低聚肽为主要成分的粉末状产品。且该标准还规定了相对分子质量低于1000 u的蛋白质水解物所占比例≥85%。

在轻工行业标准QB/T4707-2014《玉米低聚肽粉》，将玉米低聚肽粉定义为：以玉米蛋白为原料，用酶（蛋白酶）解法生产的，以相对分子质量小于1000u的低聚肽为主要成分的粉末状产品。且该标准还规定了相对分子质量低于1000 u的蛋白质水解物所占比例≥85%。

以上产品标准中，无论是行标还是国标，都将低聚肽的产品标准定义为“相对分子质量低于1000 u的低聚肽（短肽）为主要成分的粉末状产品”。饲料原料是不可能以相对分子质量低于1000u的低聚肽（短肽）为主要成分，但我们可以参考以上标准，**将饲料原料中相对分子量低于1000u的短肽规定为饲料原料中的低聚肽**。

**3.2.2 原理**

相对分子质量小于1000u的蛋白质水解物(包括低聚肽和少量游离氨基酸)所占比例,采用高效凝胶过滤色谱法测定。即以多孔性填料为固定相,依据样品组分分子体积大小的差别进行分离,在肽键的紫外吸收波长220nm条件下检测，使用凝胶色谱测定相对分子质量分布的专用数据处理软件(即GPC软件),对色谱图及其数据进行处理,计算得到蛋白质水解物的相对分子质量大小及分布范围,进而得到相对分子质量小于1000u的蛋白质水解物(包括低聚肽和少量游离氨基酸)所占比例。

**3.2.3 试验条件的确定**

（1）样品的制备

 参考文献《有效检测发酵豆粕中抗原蛋白的新方法（饲料工业，2013,34（6）:52-54）》中的样品处理方法，将发酵/蛋白饲料中蛋白提取出来。

称取粉碎后过100目筛的样品1.00g，加入20 mL0.03mol/L的Tris-HCl（pH=8.0）（包含0.03 mol/L的β-巯基乙醇）样品处理液，放在磁力搅拌器（200 r/min）上搅拌60 min，以5000 r/min 离心10 min，取上清液。上清液用孔径为0.2µm～0.5µm聚四氟乙烯或尼龙过滤膜过滤后，上机进样。

（2）分子量小于1000u蛋白质水解物所占比例的确定

该试验条件按照国家标准 GB/T 22729-2008《海洋鱼低聚肽粉》中相对分子量小于1000u蛋白质水解物所占比例，可分为相对分子质量校正曲线制作、样品制备和相对分子量的计算三个过程。

1）相对分子质量校正曲线制作

分别用流动相配制成0.1%（质量浓度）的上述不同相对分子质量的肽标准品溶液，用孔径为0.2µm～0.5µm微孔滤膜过滤后分别进样，得到系列标准品的色谱图。以相对分子质量的对数为纵坐标，以系列标准品保留时间为横坐标，得到相对分子质量校正曲线及其方程。

2）样品的制备

吸取试样提取液20mL，用0.2µm～0.5µm微孔滤膜过滤后，备用。

3）相对分子量的计算

吸取制备的样品溶液1mL于样品瓶中，在上述色谱条件下进样，利用化学工作站计算相对分子质量范围在1000u以下的蛋白质水解物比例。

四、采用国际标准

国内有几个针对低聚肽粉的产品标准，但针对饲料原料中分子量小于1000u蛋白质水解物的比例的测定还没有相关的标准。

五、与现行法律法规和强制性标准的关系

本标准的制定将会有利于饲料企业对发酵和酶解类原料质量的评价和控制，支撑《饲料原料目录》（农业部公告第1773号）中规定的“强制性标识要求”的执行。

与有关的现行法律法规和强制性国家标准没有冲突或重复。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准的制定广泛征求意见，包括生产企业、检验机构、科研院所，根据反馈意见对标准进行修改，无重大分歧意见。

七、标准作为强制性或推荐性标准的意见

本标准制定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

为了贯彻实施本行业标准，建议相关职能部门指导和指定科研机构对相关的人员进行技术培训。

九、废止现行有关标准的建议

本标准为首次制定。

十、其他应予说明的事项

无