**饲料原料 小麦水解蛋白 编制说明**

**一、标准制定背景及任务来源**

**1.1 背景和意义**

小麦水解蛋白最早由欧美国家开发生产，是以小麦中提取的蛋白质为原料，采用多种酶制剂，通过定向酶切、特定的小肽分离技术，经喷雾干燥获得。小麦水解蛋白含丰富的谷氨酰胺及小肽，是一种优质安全的新型蛋白原料，目前在各个行业中应用广泛。

小麦水解蛋白具有高营养、低抗原、低过敏、蛋白质高等优点，同时可以改善幼龄动物小肠绒毛形态和免疫力并提高生产性能，是一种极具开发潜力的饲用蛋白产品。大部分植物蛋白中含有抗营养因子，如大豆中的大豆抗原，花生粕中的凝集素等，都大大限制了其在动物生产中，尤其是幼龄动物生产中的使用。当今动物营养领域，随着对胎儿发育和幼龄动物的营养需求、消化道和免疫系统发育的深入研究，这类产品逐步受到饲料行业的关注。而在国内，经过在幼龄动物代乳粉、宠物日粮、水产和畜禽饲料中的反复尝试，小麦水解蛋白在适口性、营养性、功能性，安全性等方面均表现出优良的性能。

我国养猪行业正朝现代集约化养殖方向发展，仔猪的早期断奶已经普及。超早期断奶仔猪消化道发育尚未完全，因此对饼粕类蛋白饲料耐受度较差，而乳制品和血浆又价格偏高。因此，小麦水解蛋白是仔猪教槽料的理想蛋白来源。

农业部公告第1773号将小麦水解蛋白列入《饲料原料目录》，但我国目前还没有小麦水解蛋白的产品标准。近年来，小麦水解蛋白在畜牧行业用量愈来愈大，其品质、安全性亟待规范；通过本标准的制定，将对我国饲料用小麦水解蛋白标准的完善有重要作用，为确保小麦水解蛋白质量安全提供快速有效的监管依据，可有力支持饲料安全监管工作。对小麦水解蛋白在畜禽营养与饲料中的应用，推动饲料工业健康发展具有重要意义。

**1.2 任务来源**

本标准的制定任务来源于农财发﹝2015﹞49号《农业部关于下达2015年农业行业标准制定和修订等项目资金的通知》，项目编号：2015-44。河南省兽药饲料监察所、江苏智荟生物科技有限公司起草制定，主要起草人员有：吴志明、谭旭信、胡竑邠、吴宁鹏、杜红鸽、彭丽、陈小鸽、范念亭、刘亚彬、朱红继、邱富娜、陈阳。

**二、主要工作过程**

**2.1 成立起草小组**

2015年11月计划任务下达后，为确保项目的顺利实施，成立标准起草小组（表1），同时对标准起草工作进行分工，明确各自任务和职责。

表1 起草小组成员一览表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **姓 名** | **职称/职务** | **承担任务** |
| 吴志明 | 研究员 | 项目主持人，负责项目的全面工作。 |
| 谭旭信 | 研究员 | 企业调研、样品检测、标准文本和编制说明编写。 |
| 胡竑邠 | 总经理 | 酸溶蛋白检测方法研究。 |
| 吴宁鹏 | 研究员 | 检测方法研究、文本和编制说明修改完善。 |
| 杜红鸽 | 兽医师 | 样品检测、标准文本和编制说明编写。 |
| 彭丽 | 兽医师 | 谷氨酰胺检测方法研究、样品检测。 |
| 陈小鸽 | 研究员 | 企业调研、样品采集 |
| 范念亭 | 兽医师 | 样品检测 |
| 刘亚彬 | 技术员 | 样品检测 |
| 朱红继 | 技术员 | 样品检测 |
| 邱富娜 | 兽医师 | 样品检测 |
| 陈阳 | 兽医师 | 样品检测 |

**2.2起草**

标准起草小组人员根据分工对相关内容开展调研，查阅、搜集国内外相关的技术资料，并进行分析比对研究，为标准的起草奠定了基础。

2016年3月～2017年10月，编制单位广泛查阅国内外资料，查询国内小麦水解蛋白生产厂家详细情况，收集饲料用小麦水解蛋白样品。

2016年7月-2017年12月，编制单位测定了小麦水解蛋白样品中水分、粗灰分、粗蛋白、细度、酸溶蛋白及部分卫生指标的含量，并归纳测定数据。制定标准草案，撰写了标准编制说明草案。

2017年9-2018年4月，通过搜集、分析整理相关资料，起草小组在标准草案的基础上，修改标准的总体框架和具体内容，形成了标准和编制说明的征求意见稿草稿。

2018年5月-2018年8月，广泛征求行业专家、技术人员、生产厂家的意见。

2018年9月-2018年10月，汇总整理专家意见，并根据意见对标准文本和编制说明进行修改完善，形成预审稿。

2018年11月29日，组织专家对《饲料原料 小麦水解蛋白》（预审稿）进行了认真的审查。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如下：

1.理化指标中增加谷氨酰胺项目及相应的检测方法；

2.根据原料特性，卫生指标中应增加呕吐毒素等项目的检测数据；

3.提供不同浓度三氯乙酸对酸溶蛋白测定结果的影响；

4.工艺流程中应明确小麦水解蛋白使用的所有原料；

5.增加生产企业和用户的征求意见；

6.建议收集生产企业的实测数据，并进一步验证分级的合理性；

7.进一步补充完善编制说明；

8.按GB/T1.1-2009、GB/T20001.4和GB/T20001.10规范标准文本。

2018年12月-2019年6月，根据预审专家意见，对标准材料进行修改完善：补充了呕吐毒素、伏马毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素A等重要卫生指标的检测数据；建立了谷氨酰胺的检测方法，并根据样品的检测结果，确定了谷氨酰胺的限值。完善编制说明，增加了三氯乙酸浓度的确定依据，明确了小麦水解蛋白使用的所有原料；增加生产企业和用户的征求意见；根据样品的检测结果，验证分级的合理性；补充完善编制说明。

**三、标准编制原则**

本标准的编制原则是：在其适用范围内，内容力求完整准确，易于理解，并具备先进性、实用性（可操作性）和权威性。

本标准在制定过程中严格遵循GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写规则》及GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的要求进行编写。

本标准从内容上涵盖了范围、规范性引用文件、术语与定义、测定方法等

**四、重要技术指标确立依据及过程**

**4.1 范围**

小麦水解蛋白是以小麦面筋(或谷朊粉)为原料，经原料配制、剪切液化、蛋白酶分解和喷雾干燥处理加工生产的小麦蛋白产品，主要工艺如下：

①原料预处理：取适量谷朊粉或湿面筋除杂分后，加水调浆控制温度在规定范围之间，调节最佳pH值，加热到一定温度预处理，预处理目的是打开蛋白质的疏水键，使底物容易与酶接触，利于水解。工艺操作主要是控制好温度和时间，使蛋白质充分变性。

②酶解：将处理好的原料降温冷却到50℃左右，在不断交办情况下加入蛋白酶制剂（碱性蛋白酶、中性蛋白酶和风味酶），同时调节并控制pH值在适当范围内水解，面筋蛋白结构发生改变，分子内部疏水基团显露出来，亲水性增加，疏水性减少，水溶性增加；碱性蛋白酶和中性蛋白酶先后将面筋蛋白分解成小分子蛋白、肽、小肽（生物活性肽）和氨基酸。酶解结束后，用酸调节pH值然后升高温度灭酶，使酶变性失活。一般认为水解度增加，苦味也増加，最好控制最适水解度，可以避免苦味对产品的影响。

③分离和浓缩干燥：将水解好的水解液通过过滤装置进行过滤分离处理，剩余少量的蛋白分离出去，余下的水解液通过高压泵泵入喷雾干燥塔，在进风高温条件下喷雾干燥。

④热粉冷却:开动冷动机，将从干燥塔中收集的热粉通过旋振筛进行过筛搅拌冷却至常温。

⑤定量包装：将冷却后的成品粉输送至定量包装机，通过包装机将小麦水解蛋白粉包装成成品。

小麦水解蛋白加工工艺流程见图1。

谷朊粉或湿面筋、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、风味酶、酶制剂

1 原料验收（谷朊粉/湿谷朊） ★

2 配料溶解/前处理

3 酶解 ▲

4 喷雾干燥 ▲

5 筛分、磁选 ★

6 计量包装、检验入库★

备注：▲为关键工序 ★为质控点

**图1 小麦水解蛋白工艺流程图**

本次编制的标准包括了饲料原料小麦水解蛋白的术语和定义、技术要求、取样、试验方法、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期，同时由于国家标准中已有饲料的卫生标准要求，因此，在“范围”中描写为：

标准规定了饲料原料小麦水解蛋白的术语和定义、技术要求、取样、试验方法、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期。

本标准适用于以谷朊粉或面筋为原料，经酶水解和喷雾干燥等工艺制成的饲料原料小麦水解蛋白。

**4.2 技术指标的确立**

从国内5家主要生产企业，收集了20个小麦水解蛋白产品（表2），测定了感官性状（颜色、滋味与气味、状态）、理化指标（水分、粗蛋白、粗灰分、酸溶蛋白、谷氨酰胺的含量）和卫生指标（铅、砷、黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、赭曲霉毒素A、T-2毒素、霉菌总数、沙门氏菌）。

表2 小麦水解蛋白样品信息

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 序号 | 原编号 | 实验室编号 |
|  | S100A9B104A | S2018W0165 |
|  | S100A9B105A | S2018W0170 |
|  | S100B9B104A | S2018W0171 |
|  | S100B9B103A | S2018W0172 |
|  | S100A9B103A | S2018W0173 |
|  | 201809291 | S2018W0148 |
|  | 201810061 | S2018W0150 |
|  | 201811071 | S2018W0154 |
|  | 201812041 | S2018W0157 |
|  | 201812081 | S2018W0163 |
|  | 20180824 | S2018W0158 |
|  | 20180928 | S2018W0159 |
|  | 20181015 | S2018W0160 |
|  | 20181107 | S2018W0161 |
|  | 20181120 | S2018W0162 |
|  | 1 | S2018W0166 |
|  | 2 | S2018W0167 |
|  | 3 | S2018W0168 |
|  | 4 | S2018W0169 |
|  | 5 | S2018W0164 |

**4.2.1 小麦水解蛋白的感官性状**

感官性状指标涉及：样品的色泽、组织形态、气味。

**4.2.1.1 小麦水解蛋白的色泽**

本标准在参考有关企业标准（表3）和对课题组收集样品观察的基础上，对小麦水解蛋白色泽的规定为：呈白色、灰白色或淡黄色、色泽均匀。

表3 小麦水解蛋白相关标准中色泽的要求

|  |  |
| --- | --- |
| 单位名称 | 色泽 |
| 江苏康科食品工程技术有限公司 | 浅黄色 |
| 江苏智荟生物科技有限公司 | 白色或浅黄色粉末 |
| 武汉科泰生化科技有限公司 | 灰白色 |
| 泰州麦凯乐生物科技有限公司 | 白色或微黄色 |
| 郑州新威营养技术有限公司 | 色泽一致 |
| 课题组收集小麦水解蛋白 | 白色、灰白色或淡黄色，色泽一致 |

**4.2.1.2 小麦水解蛋白组织形态**

加工工艺对小麦水解蛋白的组织形态略有影响，常见的工艺为喷雾干燥，因此本标准定义于喷雾干燥小麦水解蛋白，喷雾干燥小麦水解蛋白一般为粉末状。

本标准在参考有关企业标准（表4）的基础上，对小麦水解蛋白组织形态的规定为：均匀粉末状，无结块。

表4 小麦水解蛋白相关标准中状态的要求

|  |  |
| --- | --- |
| **单位名称** | **状态** |
| 江苏康科食品工程技术有限公司 | 粉末状，无结块 |
| 江苏智荟生物科技有限公司 | 粉末，无结块 |
| 武汉科泰生化科技有限公司 | 干燥粉末 |
| 泰州麦凯乐生物科技有限公司 | 粉状或微粒状，无结块 |
| 郑州新威营养技术有限公司 | 粉状、无发霉变质、结块 |
| 课题组收集小麦水解蛋白 | 均匀粉末状，无结块 |

**4.2.1.3 小麦水解蛋白气味**

本标准在参考有关企业标准（表5）的基础上，对小麦水解蛋白气味的规定为：小麦水解蛋白正常气味、无异味。次质小麦水解蛋白稍有异味，无臭味和霉味；劣质小麦水解蛋白有异味、霉味等不良气味。

表5 小麦水解蛋白相关标准中气味的要求

|  |  |
| --- | --- |
| **单位名称** | **气味的规定** |
| 江苏康科食品工程技术有限公司 | 无异味 |
| 江苏智荟生物科技有限公司 | 白无不良气味，无苦味 |
| 武汉科泰生化科技有限公司 | 无异味 |
| 泰州麦凯乐生物科技有限公司 | 无异味、异臭 |
| 郑州新威营养技术有限公司 | 无异味、异臭 |
| 课题组收集小麦水解蛋白 | 具有小麦水解蛋白典型的气味，无腐败、变质气味 |

**4.2.2 小麦水解蛋白理化指标**

理化指标涉及：细度、水分、粗灰分、粗蛋白、酸溶蛋白、谷氨酰胺等指标。

**4.2.2.1 细度**

小麦水解蛋白属于喷雾干燥类产品，细度是喷雾干燥类产品的重要指标，因此本次标准制定将其纳入指标体系。

5个企业的企业标准均对细度做了规定，课题组采用《饲料粉碎粒度测定-两层筛筛分法》（GB/T 5917.1-2008）对采集的20个样品的细度进行了测定， 具体检测结果见表6。

本标准在参考有关企业、国家和课题组检测结果的基础上，对小麦水解蛋白中细度的规定为：0.42mm的分析筛筛选通过率为≥99.5%。

表6 小麦水解蛋白相关标准中细度的要求及检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品编号** | **相关标准细度的要求** | **0.42mm的分析筛筛选通过率(%)** |
| S2018W0148 | 40目过筛率≥100.0% | 100.0 |
| S2018W0150 | 40目过筛率≥100.0% | 99.8 |
| S2018W0154 | 40目过筛率≥100.0% | 100.0 |
| S2018W0157 | 40目过筛率≥100.0% | 99.7 |
| S2018W0158 | 100目过筛率≥80.0% | 100.0 |
| S2018W0159 | 100目过筛率≥80.0% | 100.0 |
| S2018W0160 | 100目过筛率≥80.0% | 100.0 |
| S2018W0161 | 100目过筛率≥80.0% | 100.0 |
| S2018W0162 | 干粉40目标准筛通过率≥99.5% | 100.0 |
| S2018W0163 | 40目过筛率≥100.0% | 100.0 |
| S2018W0164 | 全部通过40目编织筛 | 100.0 |
| S2018W0165 | 70目过筛率≥80.0% | 100.0 |
| S2018W0166 | 全部通过40目编织筛 | 99.9 |
| S2018W0167 | 全部通过40目编织筛 | 99.7 |
| S2018W0168 | 全部通过40目编织筛 | 100.0 |
| S2018W0169 | 全部通过40目编织筛 | 100.0 |
| S2018W0170 | 70目过筛率≥80.0% | 85.4 |
| S2018W0171 | 70目过筛率≥80.0% | 89.3 |
| S2018W0172 | 70目过筛率≥80.0% | 84.3 |
| S2018W0173 | 70目过筛率≥80.0% | 90.6 |
| 比利时SYRAL Belgium N.V.企业标准P3508 | 200μm过筛率≥95% | / |
| GB/T 21924-2008谷朊粉 | CB30号过筛率99.5%，且CB36号过筛率≥95% | / |
| 课题组收集样品的实测值（均值） | / | 97.4 |

**4.2.2.2 水分**

水分作为天然成分，虽然不看作营养素，但水分含量的多少，直接影响产品的感官性状，并对产品的腐败变质和营养成分的水解有一定作用。且小麦水解蛋白中蛋白含量丰富，是微生物活动的良好能量和蛋白来源，非常容易滋生微生物，影响产品品质。水分系微生物增殖所必需，因此控制饲料水分含量和活度，就能控制小麦水解蛋白中的微生物活动，减少小麦水解蛋白的酸败。此外，小麦水解蛋白水分过高还会产生板结现象。因此本次标准制定将其纳入指标体系。

收集的5个企业标准中，3个企业的企业标准均规定水分≤8.0%，1个企业的企业标准规定水分≤10.0%，1个企业的企业标准规定水分≤9.0%。采用《饲料中水分的测定》（GB/T 6435-2014）对收集的20批样品进行检测，检测结果的平均值为5.1%，具体检测结果见表7。

本标准在参考有关企业、国家和和课题组检测结果的基础上，对小麦水解蛋白水分的规定：≤8.0%。

表7 小麦水解蛋白相关标准中水分含量的要求及检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品编号** | **相关标准水分含量要求（%）** | **检测值（%）** |
| S2018W0148 | ≤8.0 | 4.3 |
| S2018W0150 | ≤8.0 | 4.9 |
| S2018W0154 | ≤8.0 | 4.2 |
| S2018W0157 | ≤8.0 | 4.2 |
| S2018W0158 | ≤8.0 | 7.6 |
| S2018W0159 | ≤8.0 | 7.1 |
| S2018W0160 | ≤8.0 | 6.2 |
| S2018W0161 | ≤8.0 | 7.6 |
| S2018W0162 | ≤8.0 | 4.7 |
| S2018W0163 | ≤8.0 | 4.6 |
| S2018W0164 | ≤9.0 | 4.6 |
| S2018W0165 | ≤8.0 | 4.3 |
| S2018W0166 | ≤9.0 | 4.5 |
| S2018W0167 | ≤9.0 | 4.7 |
| S2018W0168 | ≤9.0 | 4.9 |
| S2018W0169 | ≤9.0 | 4.4 |
| S2018W0170 | ≤10.0 | 4.8 |
| S2018W0171 | ≤10.0 | 4.6 |
| S2018W0172 | ≤10.0 | 4.9 |
| S2018W0173 | ≤10.0 | 4.7 |
| 比利时SYRAL Belgium N.V.企业标准P3508 | ≤7.0 | / |
| GB/T 21924-2008谷朊粉 | 一级≤8.0，二级≤10.0 | / |
| 课题组收集样品的实测值（均值） | / | 5.1 |

**4.2.2.3 粗灰分**

本标准认为小麦水解蛋白中的粗灰分含量是应该受限定的，粗灰分含量过高说明小麦水解蛋白中混入的杂质多，甚至可能掺入了沙石等，从而降低小麦水解蛋白的品质。因此本次标准制定将其纳入指标体系。

参照GB／T 6438-2007饲料中粗灰分的测定。本标准拟定采用该方法。

收集的5个企业标准对粗灰分含量均有规定，其中2个按照粗灰分含量进行了分级。课题组对采集的20个样品的进行了测定，测定结果平均值为1.3%，检测结果及企业标准的具体情况见表8。

本标准在参考有关企业、国家和课题组检测结果的基础上，对小麦水解蛋白粗灰分的规定：一级为≤1.2%，二级为≤2.0%。

表8 小麦水解蛋白相关标准中粗灰分含量的要求及检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品编号** | **相关标准灰分含量要求** | **检测值(%)** |
| S2018W0148 | 一级≤1.2%,二级≤3.0% | 1.0 |
| S2018W0150 | 一级≤1.2%,二级≤3.0% | 1.1 |
| S2018W0154 | 一级≤1.2%,二级≤3.0% | 1.0 |
| S2018W0157 | 一级≤2.5%,二级≤3.5% | 0.9 |
| S2018W0158 | ≤1.2% | 0.9 |
| S2018W0159 | ≤1.2% | 1.0 |
| S2018W0160 | ≤1.2% | 0.9 |
| S2018W0161 | ≤1.2% | 1.1 |
| S2018W0162 | 一级≤2.5%,二级≤3.5% | 1.9 |
| S2018W0163 | 一级≤1.2%,二级≤3.0% | 1.1 |
| S2018W0164 | ≤4.0% | 1.2 |
| S2018W0165 | ≤3.0% | 1.6 |
| S2018W0166 | ≤4.0% | 1.5 |
| S2018W0167 | ≤4.0% | 2.4 |
| S2018W0168 | ≤4.0% | 1.1 |
| S2018W0169 | ≤4.0% | 1.2 |
| S2018W0170 | ≤3.0% | 1.1 |
| S2018W0171 | ≤3.0% | 1.9 |
| S2018W0172 | ≤3.0% | 1.0 |
| S2018W0173 | ≤3.0% | 2.0 |
| 比利时SYRAL Belgium N.V.企业标准P3508 | ≤1.2% | / |
| GB/T 21924-2008谷朊粉 | 一级≤1.0（干基）,二级≤2.0（干基） | / |
| 课题组收集样品的实测值（均值） | / | 1.3 |

**4.2.2.4 粗蛋白质**

小麦水解蛋白既无抗原，也无大分子蛋白引起的肠道过敏，优于其他植物蛋白，是一种优质的无抗原植物性蛋白源。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”，其中就包含小麦水解蛋白中粗蛋白质的要求，因此本次标准制定将其纳入指标体系。

关于粗蛋白质含量的测定方法有《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》（GB 5009.5）、《饲料中粗蛋白测定方法》（GB/T 6432）、《饲料中水分、粗蛋白质、粗纤维、粗脂肪、赖氨酸、蛋氨酸快速测定 近红外光谱法》（GB/T18868）等、进出口食品和饲料中总氮和粗蛋白的检测方法 杜马斯燃烧法（SN/T 2115-2008）、谷类、豆类粗蛋白质含量的测定 杜马斯燃烧法（NY/T 2007-2011），考虑到作为饲料原料使用，因此采用《饲料中粗蛋白测定方法》（GB/T 6432-1994）。

收集的5个企业标准对粗蛋白质含量均有规定，其中3个按照粗蛋白质含量进行了分级。课题组对采集的20个样品的进行了测定，测定结果平均值为79.97%，检测结果及企业标准的具体情况见表9。

本标准在参考有关企业、国家和课题组检测结果的基础上，对小麦水解蛋白中粗蛋白的规定：一级为≥80.0%，二级为≥75.0%。

表9 小麦水解蛋白相关标准中粗蛋白含量的要求及检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品编号** | **相关标准粗蛋白含量要求** | **检测值（%）** |
| S2018W0148 | 一级≥80%，二级≥75% | 80.49 |
| S2018W0150 | 一级≥80%，二级≥75% | 80.61 |
| S2018W0154 | 一级≥80%，二级≥75% | 81.21 |
| S2018W0157 | 一级≥80%，二级≥75% | 80.52 |
| S2018W0158 | ≥78% | 80.61 |
| S2018W0159 | ≥78% | 80.21 |
| S2018W0160 | ≥78% | 79.44 |
| S2018W0161 | ≥78% | 79.30 |
| S2018W0162 | 一级≥75.0%，二级≥70.0% | 76.46 |
| S2018W0163 | 一级≥80%，二级≥75% | 78.22 |
| S2018W0164 | 一级≥80%，二级≥75%，三级≥60% | 79.84 |
| S2018W0165 | ≥75% | 79.86 |
| S2018W0166 | 一级≥80%，二级≥75%，三级≥60% | 81.02 |
| S2018W0167 | 一级≥80%，二级≥75%，三级≥60% | 81.49 |
| S2018W0168 | 一级≥80%，二级≥75%，三级≥60% | 80.61 |
| S2018W0169 | 一级≥80%，二级≥75%，三级≥60% | 79.75 |
| S2018W0170 | ≥75% | 79.86 |
| S2018W0171 | ≥75% | 79.86 |
| S2018W0172 | ≥75% | 80.21 |
| S2018W0173 | ≥75% | 79.81 |
| 比利时SYRAL Belgium N.V.企业标准P3508 | ≥79% | / |
| GB/T 21924-2008谷朊粉 | 一级≥85%（干基）二级≥80%（干基） | / |
| 课题组收集样品的实测值（均值） | / | 79.97 |

**4.2.2.5 酸溶蛋白**

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。小麦蛋白（谷朊粉）加工成小麦水解蛋白的首要目的是通过酶解过程提高其消化吸收率。酸溶蛋白是评价水解蛋白类产品的重要指标，用于衡量水解深度，与消化吸收率呈正相关。因此本次标准制定将酸溶蛋白纳入指标体系。

关于酸溶蛋白含量的测定方法有《饲料原料 发酵豆粕》（NY/T 2218-2012），《大豆肽粉 附录B》（GB/T 22492-2008）。由于小麦水解蛋白比大豆蛋白具有更大的粘性，使用上述检测方法检测时会发生起团、溶解不充分现象，本标准拟采用标准文本附录A方法进行检测。

在考察的5个企业中，2个企业的企业标准规定了酸溶蛋白的指标。课题组针对采集的20个样品测定，测定结果的平均值为25.9%，检测结果及企业标准的具体情况见表10。

本标准在参考有关企业、国家和课题组检测结果的基础上，对小麦水解蛋白中酸溶蛋白（占粗蛋白）的规定：一级为≥25.0%，二级为≥20.0%。

表10 小麦水解蛋白相关标准中酸溶蛋白含量的要求及检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品编号** | **相关标准酸溶蛋白含量要求** | **检测值（%）** |
| S2018W0148 | / | 29.1 |
| S2018W0150 | / | 25.1 |
| S2018W0154 | / | 29.4 |
| S2018W0157 | / | 27.8 |
| S2018W0158 | / | 17.9 |
| S2018W0159 | / | 17.8 |
| S2018W0160 | / | 17.7 |
| S2018W0161 | / | 21.5 |
| S2018W0162 | / | 33.6 |
| S2018W0163 | / | 33.3 |
| S2018W0164 | 小麦水解蛋白Ⅲ型≥55.00%（相对于粗蛋白） | 25.3 |
| S2018W0165 | / | 26.3 |
| S2018W0166 | 小麦水解蛋白Ⅲ型≥55.00%（相对于粗蛋白） | 26.1 |
| S2018W0167 | 小麦水解蛋白Ⅲ型≥55.00%（相对于粗蛋白） | 24.0 |
| S2018W0168 | 小麦水解蛋白Ⅲ型≥55.00%（相对于粗蛋白） | 25.3 |
| S2018W0169 | 小麦水解蛋白Ⅲ型≥55.00%（相对于粗蛋白） | 28.4 |
| S2018W0170 | / | 26.4 |
| S2018W0171 | / | 25.1 |
| S2018W0172 | / | 25.0 |
| S2018W0173 | / | 23.6 |
| 比利时SYRAL Belgium N.V.企业标准P3508 | / | / |
| GB/T 21924-2008谷朊粉 | / | / |
| 课题组收集样品的实测值（均值） | / | 25.4 |

**4.2.2.6 谷氨酰胺**

谷氨酰胺是组成蛋白质的重要氨基酸之一，也是动物体的一种条件性必需氨基酸。它在动物机体代谢中具有十分重要的功能，可以促进动物小肠绒毛膜的生长发育，促进营养物质的[同化作用](https://baike.baidu.com/item/%E5%90%8C%E5%8C%96%E4%BD%9C%E7%94%A8%22%20%5Ct%20%22_blank)，调节蛋白的合成，增强免疫系统。它还能刺激生长激素的产生，促进皮肤的快速愈合，提高机体的运动耐力等。关于谷氨酰胺含量的测定方法目前还没有检测标准，本标准拟采用标准文本附录B方法进行检测。

课题组针对采集的20个样品的测定结果平均值为25.58%，具体检测结果见表11。参照样品检测结果，对小麦水解蛋白中谷氨酰胺的规定为：≥20.0%。

表11 小麦水解蛋白中谷氨酰胺含量检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品编号** | **相关标准谷氨酰胺含量要求** | **检测值（%）** |
| S2018W0148 | / | 27.16 |
| S2018W0150 | / | 25.79 |
| S2018W0154 | / | 29.56 |
| S2018W0157 | / | 25.73 |
| S2018W0158 | / | 23.91 |
| S2018W0159 | / | 23.73 |
| S2018W0160 | / | 26.77 |
| S2018W0161 | / | 24.58 |
| S2018W0162 | / | 28.36 |
| S2018W0163 | / | 25.20 |
| S2018W0164 | / | 24.90 |
| S2018W0165 | / | 24.20 |
| S2018W0166 | / | 26.79 |
| S2018W0167 | / | 24.12 |
| S2018W0168 | / | 25.20 |
| S2018W0169 | / | 23.43 |
| S2018W0170 | / | 25.78 |
| S2018W0171 | / | 25.87 |
| S2018W0172 | / | 24.97 |
| S2018W0173 | / | 25.58 |
| 比利时SYRAL Belgium N.V.企业标准P3508 | / | / |
| GB/T 21924-2008谷朊粉 | / | / |
| 课题组收集样品的实测值（均值） | / | 25.58 |

**4.2.3 小麦水解蛋白卫生指标**

卫生指标应符合GB 13078-2017规定，本标准核查了：铅、砷、黄曲霉素B1、赭曲霉毒素A、呕吐毒素、T-2毒素、玉米赤霉素烯酮、霉菌总数、沙门氏菌。

**4.2.3.1 铅**

食品铅污染严重影响人类健康，铅半衰期长，通过食物链的蓄积作用在体内达到一定浓度后，可对人体产生各种急慢性毒性，造成神经、消化、血液和泌尿系统损伤。联合国粮农组织( FAO) 和世界卫生组织(WHO)食品添加剂与污染物联合专家委员会(JEFCA)建议人体铅的每周耐受摄入量为25µg/体重。

本课题组数据结果采用的检测方法为《饲料中铅的测定》（GB/T 13080），具体检测结果见表12。

本标准对小麦水解蛋白中铅含量（以Pb计）的规定为：按饲料卫生标准GB 13078-2017的规定≤10 mg/kg。

表12 小麦水解蛋白相关标准中铅的要求及检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品编号** | **相关标准铅的要求（mg/kg）** | **检测值（mg/kg）** |
| S2018W0148 | ≤5（以Pb计） | 0.42 |
| S2018W0150 | ≤5（以Pb计） | 0.40 |
| S2018W0154 | ≤5（以Pb计） | 0.56 |
| S2018W0157 | ≤5（以Pb计） | 0.47 |
| S2018W0158 | / | 0.51 |
| S2018W0159 | / | 0.47 |
| S2018W0160 | / | 0.50 |
| S2018W0161 | / | 0.46 |
| S2018W0162 | ≤5 | 0.49 |
| S2018W0163 | ≤5（以Pb计） | 0.61 |
| S2018W0164 | / | 0.63 |
| S2018W0165 | / | 1.01 |
| S2018W0166 | / | 0.56 |
| S2018W0167 | / | 0.51 |
| S2018W0168 | / | 0.60 |
| S2018W0169 | / | 0.57 |
| S2018W0170 | / | 0.47 |
| S2018W0171 | / | 0.47 |
| S2018W0172 | / | 0.72 |
| S2018W0173 | / | 1.12 |
| 比利时SYRAL Belgium N.V.企业标准P3508 | / | / |
| GB/T 21924-2008谷朊粉 | ≤10 | / |
| 课题组收集样品的实测值（均值） | / | 0.58 |

**4.2.3.2 砷**

砷，俗称砒霜，是一种非金属[元素](http://baike.baidu.com/subview/19993/7619296.htm%22%20%5Ct%20%22_blank)，三氧化二砷在中国古代文献中称为[砒石](http://baike.baidu.com/view/91076.htm%22%20%5Ct%20%22_blank)或砒霜。由于砷在自然界中存在广泛，能被动物摄入体内，主要通过植物性食物、饮用水和空气及服用含砷的药物进入生物体内。饲料中允许使用的含砷化合物有：洛克沙胂和氨苯胂酸，均规定了产蛋鸡禁用。2017年5月中国兽药典委员会办公室也建议停止氨苯砷酸等3种药物饲料添加剂在食品动物上使用。

本课题组数据结果采用的检测方法为《饲料中总砷的测定》（GB/T 13079-2006）。课题组对收集的20个样品进行了总砷的测定，结果表明，小麦水解蛋白中砷平均含量为0.022mg/kg，范围0.011～0.035mg/kg，具体结果见表13。

综上，本标准对小麦水解蛋白中总砷含量（以As计）的规定为：按饲料卫生标准GB 13078-2017的规定≤2mg/kg。

表13 小麦水解蛋白相关标准中砷的要求及检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品编号** | **相关标准砷的要求（mg/kg）** | **检测值（mg/kg）** |
| S2018W0148 | ≤3（以As计） | 0.018 |
| S2018W0150 | ≤3（以As计） | 0.031 |
| S2018W0154 | ≤3（以As计） | 0.033 |
| S2018W0157 | ≤3（以As计） | 0.021 |
| S2018W0158 | / | 0.012 |
| S2018W0159 | / | 0.021 |
| S2018W0160 | / | 0.014 |
| S2018W0161 | / | 0.021 |
| S2018W0162 | ≤2 | 0.011 |
| S2018W0163 | ≤3（以As计） | 0.019 |
| S2018W0164 | / | 0.021 |
| S2018W0165 | / | 0.019 |
| S2018W0166 | / | 0.026 |
| S2018W0167 | / | 0.021 |
| S2018W0168 | / | 0.014 |
| S2018W0169 | / | 0.029 |
| S2018W0170 | / | 0.019 |
| S2018W0171 | / | 0.027 |
| S2018W0172 | / | 0.031 |
| S2018W0173 | / | 0.035 |
| 比利时SYRAL Belgium N.V.企业标准P3508 | / | / |
| GB/T 21924-2008谷朊粉 | ≤2 | / |
| 课题组收集样品的实测值（均值） | / | 0.022 |

**4.2.3.3 真菌毒素指标**

应符合GB 13078 饲料卫生标准中真菌毒素限量的规定，即黄曲霉毒素B1≤30 µg/kg，赭曲霉毒素A≤100 µg/kg、呕吐毒素≤5 mg/kg、T-2毒素≤0.5 mg/kg、玉米赤霉烯酮≤1 mg/kg。样品具体检测结果见表14。

表14小麦水解蛋白相关标准中真菌毒素的要求及检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检测值样品编号 | 相关企业标准含量要求（≤µg/kg） | 检测值（µg/kg） |
| 黄曲霉毒素B1 | 赭曲霉毒素A | 呕吐毒素 | T-2毒素 | 玉米赤霉烯酮 | 黄曲霉毒素B1 | 赭曲霉毒素A | 呕吐毒素 | T-2毒素 | 玉米赤霉烯酮 |
| S2019S0148 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 574 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0150 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 559 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0154 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 483 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0157 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 428 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0158 | / | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 303 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0159 | / | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 896 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0160 | / | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 921 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0161 | / | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 537 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0162 | 10.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 721 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0163 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 1020 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0164 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 750 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0165 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 1410 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0166 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 2.99 | 590 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0167 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 761 | 32.63 | 未检出 |
| S2019S0168 | 30.0 | / | / | / | / | 2.05 | 未检出 | 1060 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0169 | 30.0 | / | / | / | / | 未检出 | 未检出 | 2400 | 28.02 | 未检出 |
| S2019S0170 | 30.0 | / | / | / | / | 7.70 | 21.46 | 974 | 36.74 | 未检出 |
| S2019S0171 | 30.0 | / | / | / | / | 9.61 | 24.80 | 1050 | 25.81 | 未检出 |
| S2019S0172 | 30.0 | / | / | / | / | 7.78 | 19.88 | 947 | 未检出 | 未检出 |
| S2019S0173 | 30.0 | / | / | / | / | 9.86 | 25.00 | 572 | 未检出 | 未检出 |
| GB 13078-2017 | 30 | 100 | 5000 | 500 | 1000 | / | / | / | / | / |

**4.2.3.4 微生物污染物**

应符合GB 13078 饲料卫生标准中真菌毒素限量的规定。具体检测结果见表15。

表15小麦水解蛋白相关标准中微生物污染物的要求及检测结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品编号检测值 | 相关企业标准含量要求 | 检测值 |
| 霉菌总数（CFU/g） | 沙门氏菌（25g中） | 霉菌总数（CFU/g） | 沙门氏菌（25g中） |
| S2019S0148 | / | / | ＜103 | 25g中不存在 |
| S2019S0150 | / | / | ＜103 | 25g中不存在 |
| S2019S0154 | / | / | ＜103 | 25g中不存在 |
| S2019S0157 | / | / | ＜102 | 25g中不存在 |
| S2019S0158 | ≤1000CFU/g | 不得检出 | 4×103 | 25g中不存在 |
| S2019S0159 | ≤1000CFU/g | 不得检出 | 2.2×102 | 25g中不存在 |
| S2019S0160 | ≤1000CFU/g | 不得检出 | 1.3×103 | 25g中不存在 |
| S2019S0161 | ≤1000CFU/g | 不得检出 | 1.3×103 | 25g中不存在 |
| S2019S0162 | / | 不得检出 | ＜102 | 25g中不存在 |
| S2019S0163 | / | / | ＜103 | 25g中不存在 |
| S2019S0164 | / | 不得检出 | ＜10 | 25g中不存在 |
| S2019S0165 | / | / | ＜103 | 25g中不存在 |
| S2019S0166 | / | 不得检出 | ＜103 | 25g中不存在 |
| S2019S0167 | / | 不得检出 | ＜103 | 25g中不存在 |
| S2019S0168 | / | 不得检出 | ＜103 | 25g中不存在 |
| S2019S0169 | / | 不得检出 | ＜10 | 25g中不存在 |
| S2019S0170 | / | / | ＜10 | 25g中不存在 |
| S2019S0171 | / | / | ＜10 | 25g中不存在 |
| S2019S0172 | / | / | ＜10 | 25g中不存在 |
| S2019S0173 | / | / | ＜10 | 25g中不存在 |
| GB 13078-2017 | ＜4×104 | 不得检出 | / | / |

**4.2.4 分级情况**

对20批样品的检测结果进行汇总分析，根据已确定的各项技术指标进行分级，分级情况见表16。20批样品中5批样品为一级，7批样品为二级，8批样品不合格。不合格项目有细度、灰分和酸溶蛋白，不合格原因主要为企业标准中技术与本标准不一致，或未对该项目进行监测，如酸溶蛋白。



**4.2.5检测方法编制说明**

**4.2.5.1酸溶蛋白检测方法**

检测方法依据GB/T 22729-2008《海洋鱼低聚肽粉》中“6.3低聚肽”，在检测中发现有3个问题，（1）“称取2g样品”，称样量过大，不符合实际。（2）“加入10mL 15%的三氯乙酸”， 直接加入三氯乙酸，小麦肽溶解性不好。（3）“4000r/min下离心”，离心速度低。

通过分析，并参照相关企业的检测标准，我们将方法调整如下：（1）称取0.2g（精确至0.001 g）样品。（2）加入5 mL 纯水溶解充分后，再加入5mL30% 三氯乙酸，充分混匀，静置10分钟，三氯乙酸的浓度与GB/T 22729-2008一致。（3）将样品溶液在10000 r/min下离心10min后，取全部清液。

其它步骤未做调整，依据GB/T 22729-2008。

方法调整后，通过数据比对，检测结果稳定可靠，满足要求。

**4.2.5.2谷氨酰胺检测方法**

谷氨酰胺是组成蛋白质的重要氨基酸之一，也是动物体的一种条件性必需氨基酸。它可以促进动物小肠绒毛膜的生长发育，促进皮肤的快速愈合，提高机体的运动耐力等，在动物机体代谢中具有十分重要的功能，但谷氨酰胺的难溶性和不稳定性限制了它的推广和应用。谷氨酰胺结合态是谷氨酰胺和其他氨基酸形成的二肽或多肽，他的溶解度和稳定性都比谷氨酰胺好，而且大量研究表明，结合态比游离态谷氨酰胺具有更好的营养效象。

小麦蛋白具有丰富的谷氨酰胺，以小麦蛋白为原料通过酶解制备含有结合态谷氨酰胺活性肽的研究受到国内外高度关注。目前测定蛋白质及肽中氨基酸含量时首先用盐酸水解样品，此时蛋白质及肽中的谷氨酰胺转化为相应的谷氨酸，后者也是蛋白质中的固有氨基酸。因此，分析报告中谷氨酸的含量实际是谷氨酰胺转化所得谷氨酸与蛋自质中固有谷氨酸含量之和。

目前结合态谷氨酰胺的测定方法主要有基因或序列分析法、酶解法和BTI试剂保护法。基因序列法因操作周期长、难度大、费用高等原因而无法普及。酶解法因无法确保结合态谷氨酰胺的完全释放，也不能有效利用。BTI保护法是基于蛋白质中谷氨酰胺（也称作结合态谷氨酰胺）与试剂〔二（三氟乙酰氧基）碘〕苯，缩写为BTI）反应转化为对酸稳定的L－2，4－二氨基丁酸（DABA），因此可以通过测定BTI保护后样品中DABA含量来计算谷氨酰胺含量。但该法需要DABA作为标准品且价格较高，而且结合态谷氨酰胺与DABA的反应产物未必全是DABA。根据BTI衍生化反应原理，通过BTI保护和未经保护蛋白质样品经酸水解后谷氨酸含量差值来计算蛋白质中谷氨酰胺含量。

（1）仪器条件的确定

用氨基酸混合标准工作液按仪器说明书，调整仪器操作参数和洗脱用柠檬酸钠缓冲液的pH，使谷氨酸分辨率≥85%，进样量为20μL， 洗脱条件如下表17：谷氨酸标准工作液和氨基酸混合标准工作液色谱图分别见图2和图3。从图中可以看出，在此液相条件下谷氨酸峰形良好，并且不受其它氨基酸干扰。

表17 氨基酸分析仪洗脱条件

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 时间 | B1（%） | B2（%） | B3（%） | B4（%） | B5（%） | 柱温 | 流速 1 | R1（%） | R2（%） | R3（%） | 流速2 |
| 0.0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 53 | 0.4 | 50 | 50 | 0 | 0.35 |
| 2.5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| 2.6 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| 6.1 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| 6.2 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| 14.8 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| 14.9 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| 29.0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| 29.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 50 | 50 | 0 |
| 32.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 50 | 50 | 0 |
| 32.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 50 | 50 | 0 |
| 33.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 |
| 33.1 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 34.0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 34.1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 37.0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 37.1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 |
| 53.0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 |



图2 谷氨酸标准工作液色谱图



图3 氨基酸混合标准溶液色谱图

（2）前处理条件的优化：

参考相关文献及企业标准，对谷氨酰胺的前处理条件进行优化。准确称取1g样品（精确至0.0001g），置于250 mL烧杯中，准确加入100.00 mL水，振荡30 min，再50-60℃超声30 min，可以使样品充分溶解和分散，制成10 mg/mL的样品溶液，准确移取1.00 mL进行下一步BTI衍生和酸水解。由于小麦水解蛋白样品不能完全溶解于水，静置后会产生沉淀，因此需在磁力搅拌状态下移取，以保证检测结果的准确性和重复性。

对于BTI衍生过程进行考察。 添加相当于3mg谷氨酰胺的L-丙氨酰-L-谷氨酰胺（Ala-Gln）标准溶液于1mL样品溶液中，氮气吹干后分别用两个方案：方案1：50-60℃超声1h， 60 ℃水浴震荡1.5h ；方案2：混合均匀后充氮气，封盖后于50℃烘箱中反应4h，进行衍生反应。酸水解后上机检测，扣除样品溶液中谷氨酰胺的含量，计算添加回收率。两种衍生过程谷氨酰胺回收率的结果见图4，从图中可以看出方案1的衍生效果较好。

图4 BTI衍生过程的考察

采用标准添加法，对BTI试剂的添加量进行优化，比较了400µL、600µL、800µL、1200 µLBTI 试剂添加量对试验结果的影响，回收率见图5。

图5 BTI试剂添加量的考察

结果表明随着BTI 添加量增加，谷氨酰胺的回收率有明显的提高，当BTI添加量达到800 µL后回收率趋于稳定，因此将BTI添加量确定为800 µL。

GB/T 18246-200《饲料中氨基酸的测定》酸水解的步骤为：加6mol/L盐酸，（110±1）℃恒温干燥箱中，水解22~24h。参考企业标准，我们采用145℃恒温干燥箱中，水解4h。结果表明样品中的谷氨酰胺能够水解完全，并且能节省大量时间。

由于水解液含高浓度盐酸，需要进行溶剂替换并稀释至适宜浓度后才能上机检测。我们考察了两种试验方案，方案1：准确吸取样品水解液100 µL，吹干，加入2 mLpH2.2柠檬酸钠缓冲溶液溶解残余物，过0.22 µm滤膜；方案2：准确吸取样品水解液2.5 mL至50mL容量瓶中，加6 mol/L氢氧化钠溶液2.5 mL和0.02 mol/L盐酸溶液（pH2.2）35 mL，调节溶液pH值在2~3之间，再用0.02 mol/L盐酸溶液（pH2.2）定容至刻度。结果表明，两种稀释方式结果差异不大，但方案2需要调节溶液pH值，操作繁琐，因此采用方案1进行稀释。

试验步骤最终确定如下：

1.样品溶液配制

准确称取1g样品（精确至0.0001g），置于250 mL烧杯中，准确加入100.00 mL水，振荡30 min，再50-60℃超声30 min，使样品充分溶解和分散，制成10 mg/mL的溶液。

2.BTI衍生

在磁力搅拌状态下准确量取样品液1.00 mL于水解管中，加入100 μL吡啶水溶液，再加800 μL BTI-乙腈溶液，封口，50-60℃超声1h，60 ℃水浴震荡1.5h，氮气60℃以下吹干。

3.对照处理

在磁力搅拌状态下准确量取样品液1.00 mL于水解管中，加入100 μL吡啶水溶液，再加800 μL BT乙腈，封口，50-60℃超声1h，60 ℃水浴震荡1.5h，氮气60℃以下吹干。

4.酸水解

BTI处理组与对照组水解管分别准确加入5.00 mL 6 mol/L盐酸，封口后在烘箱中145 ℃水解4 h。准确吸取水解液100 µL，吹干，加入2 mLpH2.2柠檬酸钠缓冲溶液溶解残余物，过尼龙微孔滤膜，进氨基酸分析仪检测。

（3）方法学考察：

1. 适用范围

移取适量Ala-Gln标准溶液，用水稀释，按谷氨酰胺计，分别配制成浓度为0.2mg/mL、3 mg/mL、6 mg/mL的 Ala-Gln标准工作液，准确移取1mL BTI衍生和酸水解处理后上机测定，计算谷氨酰胺的回收率。每个浓度进行6次重复试验，计算平均回收率和相对标准偏差，结果见表18。0.3mg/mL和6 mg/mL标准溶液（以谷氨酰胺计）的色谱图分别见图6和图7 。

表 18 Ala-Gln回收率

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 添加量（mg/mL） | 回收率（%） | 平均回收率（%） | 相对偏差（n=6，%） |
| 0.2 | 98.55 | 101.09 | 102.18 | 100.18 | 96.55 | 100.55 | 99.7 | 2.2 |
| 3.0 | 97.85 | 96.45 | 97.82 | 100.09 | 98.85 | 95.06 | 98.2 | 1.4 |
| 6.0 | 98.76 | 100.15 | 100.11 | 96.97 | 96.91 | 98.71 | 98.6 | 1.6 |

结果表明在0.2 mg/mL~6 mg/mL浓度范围内，谷氨酰胺的平均回收率在98%以上，变异系数小于22.2%。由于样品溶液的浓度为10 mg/mL，相当于样品中谷氨酰胺含量在2%~60%范围内，该方法均能保证结果的准确性。



a

图6 0.3mg/mL标准溶液（以谷氨酰胺计）色谱图

b

（a为样品，b为对照）



a



b

图7 6 mg/mL标准溶液（以谷氨酰胺计）色谱图

（a为样品，b为对照）

2. 精密度和准确度

采用标准添加法，分别在1mL的样品A和样品B溶液中添加相当于2 mg谷氨酰胺的Ala-Gln标准溶液，BTI保护和酸水解处理后上机测定，空白和添加各进行6次重复试验，计算添加回收率和相对标准偏差，结果见表19和表20，色谱图见图8~图10。从表中可以看出，样品A和样品B 的平均回收率分别为96.63%和101.76%，相对偏差均小于4%。说明该方法对小麦水解蛋白中谷氨酰胺的测定有较好的准确度和精密度。

表19 样品A中谷氨酰胺的添加回收数据

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品A | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 相对偏差（n=6，%） |
| 添加前谷氨酰胺含量（%） | 24.66 | 23.84 | 24.04 | 24.49 | 24.27 | 23.39 | 1.92 |
| 添加后谷氨酰胺含量（%） | 43.78 | 42.71 | 43.70 | 43.36 | 43.36 | 43.73 | 0.93 |
| 回收率（%） | 95.60 | 94.35 | 98.30 | 94.35 | 95.45 | 101.70 | 2.98 |
| 平均回收率（%） | 96.63 | / |

表20 样品B中谷氨酰胺的添加回收数据

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品B | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 变异系数（n=6，%） |
| 添加前谷氨酰胺含量（%） | 23.79 | 23.45 | 23.78 | 22.58 | 23.47 | 23.25 | 1.91 |
| 添加后谷氨酰胺含量（%） | 43.71 | 44.10 | 44.46 | 42.90 | 44.13 | 43.13 | 1.40 |
| 回收率（%） | 99.60 | 103.25 | 103.40 | 101.60 | 103.30 | 99.40 | 1.84 |
| 平均回收率（%） | 101.76 | / |



图8谷氨酸标准溶液色谱图（0.1mmol/L）

 

b

a

图9 样品溶液色谱图（a为样品，b为对照）



a



b

图10 样品添加溶液色谱图（a为样品，b为对照）

**五、采用国际标准**

未采用国际标准

**六、与现行法律法规和强制性标准的关系**

本标准的编制依据为现行的法律、法规和强制性国家卫生标准，参照了GB/T 21924-2008《谷朊粉》、GB 13078-2017《饲料卫生标准》等，指标与这些文件中的规定相一致。

**七、重大分歧意见的处理经过和依据**

说明各方面专家对标准主要内容（如参数、指标、试验方法）有哪些重大分歧，以及标准起草单位在修订完善标准过程中，对专家分歧意见的处理情况和处理的主要依据。

**八、标准作为强制性或推荐性标准的意见**

建议本标准作为行业推荐性标准，凡是在我国境内生产和销售的用于饲料的小麦水解蛋白产品，其质量都应符合本标准的规定，以保障广大消费者的健康和安全。

**九、贯彻标准的要求和措施建议**

本标准发布后，应广泛组织宣传贯彻，指导饲料原料小麦水解蛋白的生产，有助于生产企业提高产品质量。

**十、废止现行有关标准的建议**

本标准为首次制定，无替代、废止现行有关标准。

**十一、其他应予说明的事项**

无。