

饲料原料大豆及其加工产品中胰蛋白酶抑制剂活性测定

编制说明

(公开征求意见稿)

2024年12月

目录

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、工作过程等.....	1
（一）标准制定任务来源	1
（二）标准制定背景	1
（三）主要工作过程	2
二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据	3
（一）标准编制原则	3
（二）标准主要修订内容及其确定依据	3
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果.....	4
（一）样品的采集和制备	4
（二）样品的测定	6
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外 样品、样机的有关数据对比情况	9
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准.....	9
六、与有关法律、法规的关系	9
七、重大分歧意见的处理经过和依据	9
八、涉及专利的有关说明	9
九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和 实施日期的建议等措施建议	9
十、其他应当说明的事项	9

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、工作过程等

（一）标准制定任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于印发《2024 年国家标准立项指南》的通知》（国标委发〔2024〕4 号），项目编号为 20240359-T-469，项目名称为《动物饲料 大豆及其加工产品中胰蛋白酶抑制剂活性测定》，项目承担单位为中国农业大学、益海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司、谱尼测试集团股份有限公司，本标准制定任务来源于中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会，由全国饲料工业标准化技术委员会归口管理。

本标准得到了十四五国家重点研发课题“饲料及畜产品质量安全高通量智能快检技术及装备研发（2023YFD1301501）”的经费支持。

（二）标准制定背景

1、标准制定的目的和意义

蛋白酶抑制剂泛指具有抑制蛋白酶活性作用的一类物质，在动物、植物、微生物中广泛存在，能与体内参与各种调控作用的丝氨酸蛋白酶形成一定的动态平衡，调节生物体内许多重要的生命活动过程。胰蛋白酶抑制剂为大豆主要的抗营养因子，在种子中检测到其含量是总蛋白的 6-8%，生大豆的抗营养作用 40% 是由胰蛋白酶抑制剂造成的。它能抑制动物生长同时引起动物胰腺变大。胰蛋白酶抑制剂在引起动物体内蛋白质内源性消耗的同时，与小肠液中胰蛋白酶结合产生没有活性的复合物会随着粪便一起排出动物体外，从而在一定程度上使胰

腺产生补偿性反应，造成胰腺分泌变多和必需氨基酸的内源性的损失，以致动物饲喂大豆及豆制品后，体内氨基酸代谢失调或不平衡，最终导致蛋白质利用率和消化率的降低。在大部分动物试验中，证明了饲料大豆中的胰蛋白酶抑制剂具有阻碍动物的生长、减少动物对脂肪吸收，从而使动物胰腺酶过量分泌的作用。现代动物营养学研究发现，日粮中大豆胰蛋白酶抑制剂的活性降低 10%~15%，肉鸡体重会增加 0.1 kg 左右。从肉鸡养殖效益方面考量，降低动物饲料大豆及其加工产品中胰蛋白酶抑制剂活性，即可减轻其对肉鸡增重和饲料转化率造成的负面影响。

为了改善大豆制品的营养质量，抗营养因子必须在饲料加工过程中除去，否则会对人体造成伤害。目前，关于大豆蛋白抗营养因子的降低或消除，通常采用物理、化学、生物学等方法进行钝化处理。物理失活法包含热处理法、微波处理、压力处理、超声波处理及高压脉冲电场处理。Radha 等发现在 100℃ 处理 40 min 后胰蛋白酶抑制剂活性降为原来的 11.7%，118℃ 加热 10 min 后活性下降为原来的 10.7%，136℃ 处理 5 min 后活性降为原来的 2.4%。Plahar 等在 100℃ 下处理大豆发现胰蛋白酶的抑制活性得到了有效降低，并去除了豆腥味。化学失活法包括还原剂处理法和酚类化合物处理法。还原剂可打断 KTI 和 BBI 中的二硫键，改变分子构型，使其不能与胰蛋白酶结合，从而钝化胰蛋白酶抑制剂，已采用过的化学物质有亚硫酸钠、硫代硫酸钠、戊二醛以及一些含硫醇基的化合物。Herkelman 等报道，在处理大豆过程中添加还原剂亚硫酸氢钠，可使钝化时间减少一半。

酚类化合物的作用原理主要是酚类物质与蛋白质类的胰蛋白酶抑制剂有较强的络合作用，使胰蛋白酶抑制剂的结构发生改变而失活。生物失活法主要是酶水解法及微生物发酵去除法。酶法失活是利用蛋白酶的水解作用除去大豆制品中的胰蛋白酶抑制剂。相对于热处理，酶法失活无残留、应用安全、处理效率高，既保护了热敏性必需氨基酸，还可以水解外源凝集素和致敏因子，同时使豆制品中的蛋白质水解成短肽，更好地提高了豆制品的营养价值。杨晓泉等通过添加碱性内切蛋白酶（Alcalase）水解大豆蛋白，在最适条件水解后，胰蛋白酶的残留活性为对照的 20%。Hoffmann 等利用牛瘤胃液对大豆和饲料的混合物进行体外发酵，发现经发酵后大豆中的胰蛋白酶抑制剂被降解失活。

综上所述，对动物饲料大豆及其加工产品中胰蛋白酶抑制剂活性评估方法研究具有非常重要的实际应用价值。

2、国内外标准研究现状

目前，国内外饲料、食品中大豆制品的胰蛋白酶抑制剂活性测定检测方法主要是紫外分光光度法（表 1），采样苯甲酰-L-精氨酸-对硝基苯胺（简称 BAPA）和苯甲酰-L-精氨酸- β -萘酰胺（简称 BANA）测定酰胺酶活力。如 ISO 14902:2001 《Animal feeding stuffs - Determination of trypsin inhibitor activity of soya products》、GB 5009.224-2016 《食品安全国家标准 大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》，NY/T 1103.2-2006 《转基因植物及其产品食用安全检测 抗营养素 第 2 部分：胰蛋白酶抑制剂的测定》。现行食品安全国家标

准 GB 5009.224-2016 修改采用 ISO 14902:2001，GB 5009.224-2016 已经使用 8 年，其适用范围表述比较笼统，且并没有涉及到饲料用大豆加工产品的测定。国际标准 ISO 14902:2001《Animal feeding stuffs - Determination of trypsin inhibitor activity of soya products》，是 2001 年由 ISO 发布并实施，此国际标准是大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性测定的指导性文件，从检测范围、原理、试剂和材料、仪器设备、测定步骤、结果计算、精密度等方面进行了全面而详细的规定。2001 年发布以来，每间隔五年 ISO 会评估一次标准适用性，此标准已通过评估，仍是目前现行有效的国际标准。相比于现有的类似国家标准，国际标准 ISO 14902:2001 更加科学而准确，但国际标准的应用范围并不符合我国实际生产需要，且其相关表述与我国国人习惯性表述有一定出入，所以本次国标采用修改国际标准 ISO 14902:2001 《Animal feeding stuffs - Determination of trypsin inhibitor activity of soya products》的形式进行制定。本次制定拟按相关饲料法律法规和标准等要求对其适用范围进行 进具体明确表述，修改仪器设备配置、试验步骤，并按照 GB/T 1.1—2020、GB/T 1.2—2020 和 GB/T 20001.4—2015 对规范标准文本。

表 1 国内外食品和饲料中胰蛋白酶抑制剂活性的测定方法标准

序号	标准编号	标准名称
1	ISO 14902:2001	Animal feeding stuffs - Determination of trypsin inhibitor activity of soya products 动物饲料 大豆产品的胰蛋白酶抑制剂活性的测定
2	GB 5009.224-2016	食品安全国家标准 大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活

		性的测定
3	NY/T 1103.2-2006	农业行业标准 转基因植物及其产品食用安全检测 抗营养素 第2部分：胰蛋白酶抑制剂的测定

（三）主要工作过程

1、成立标准编制小组

2024年3月-4月，接到标准制定任务后，本项目成立了标准编制工作组，负责标准的起草。中国农业大学对该标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案，并成立了以中国农业大学、谱尼测试集团股份有限公司相关专家人员组成的标准编制小组，落实了人员分工，详见表 2。

表 2 标准主要起草人员和任务分工

人员	单位	任务分工
贺平丽	中国农业大学	项目主持人，负责项目的全面工作
宋青龙	中国农业大学	项目实施方案、标准文本和编制说明编写和完善、征求意见、方法验证
杨爽	中国农业大学	标准文本和编制说明编写和完善、样品选取、样品检测
苏乐萍、崔园园、何东慧	谱尼测试集团股份有限公司	检测方法研究、样品检测
高峰、王春程	益海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司	检测方法研究、标准文本和编制说明编写

2、查询国内外相关标准和文献资料

2023年5月，标准编制小组成员查阅了国内外相关标准和文献（包含国际标准ISO 14902:2001 《Animal feeding stuffs - Determination of trypsin inhibitor activity of soya products》，该标准仍在有效使用期中），

确立了标准修订指导思想，形成了标准草案工作组讨论稿，并初步制定实施方案。

3、确定标准制定技术路线，制定原则

2023年6月，中国农业大学、益海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司、谱尼测试集团股份有限公司组织有关专家、主要起草人员召开标准修订项目启动研讨视频会，会上标准编制小组介绍了对国内外相关分析方法的研究，标准制定的技术路线和技术难点，以及拟开展的主要工作等内容，并进一步确定了标准修订的主要内容、技术路线、分工、完成时限等。

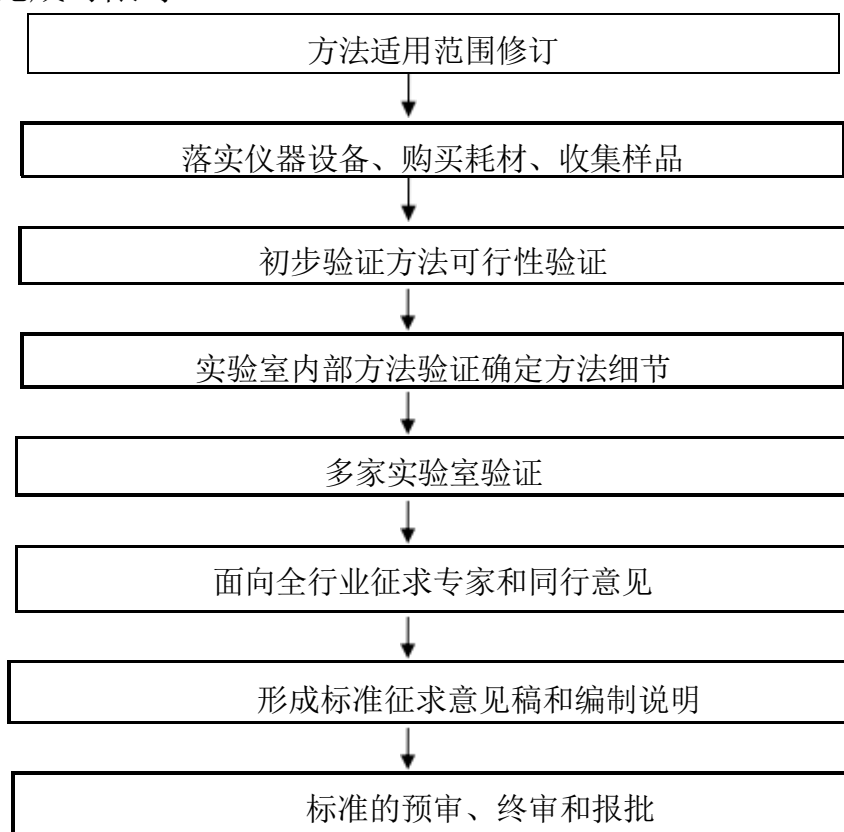


图 1 标准修订技术路线

3、进行论证实验，确定方法主要试验技术内容制定的合理性

2023年7~8月，在查询、收集国内外相关标准、文献和技术资料的基础上，在参照国际和国外先进标准的基础上，结合目前的实际情

况，确定了标准制定主要研究内容和相应的试验方法，确定了标准制定实施方案。

4、标准方法研究和征求意见稿形成

2023年9月-12月，对国际标准ISO 14902:2001《Animal feeding stuffs - Determination of trypsin inhibitor activity of soya products》（英文版）进行翻译，经过几轮校对，确定国际标准的中文翻译稿，使中文翻译稿内容尽量与国际标准英文版一致，撰写标准草案。

2024年3月-7月，制标单位采集了不同种类、规格、生产厂家的68个具有代表性的样品，其中生大豆样品24个，膨化大豆样品10个，发酵豆粕样品11个，豆粕样品10个，酶解豆粕样品10个，大豆浓缩蛋白样品3个，根据标准草案进行了测定；后又采集了不同产地的682个生大豆样品进行验证，实验内容将在第三节详细阐述。在系统的实验论证基础上，进一步对国际标准ISO 14902:2001充分优化，并经多次网络会议和技术交流，参考现有国标的写作模式，对标准内容和结构的修改进行研讨，2024年8月份最终形成《动物饲料大豆及其加工产品中胰蛋白酶抑制剂活性测定》定向征求意见稿。

5、方法验证

2024.10-11 对标准进行方法验证。

6、定向征求意见

2024.8-10 对标准进行定向征求意见。

7、形成预审稿

2024.11 按照定向征求意见进行修改后形成预审稿，召开预审会议。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

1、规范性

本标准的编写制定过程以提高测试方法的选择性、准确度、重复性和分析效率为总原则，制定过程中严格遵循国家有关政策、法规和规章，标准的编写及表述按照GB/T1.1—2020《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》、GB/T1.2—2020《标准化工作导则第2部分：以ISO/IEC标准化文件为基础的标准化文件起草规则》和GB/T20001.4—2015《标准编写规则第4部分：试验方法标准》的规定和要求编写标准全文。查阅了国内外相关标准，结合现行标准实施情况，以保证标准的科学性、先进性、协调性和衔接性。

本文件立项时要求等同采用ISO 14902:2001国际标准，但针对我国饲料行业实际检测水平和检测需要，需要对文本的技术内容进行修改，如更改适用范围和精密度；同时根据我国国家标准的规范性写作要求，需要对文本的格式和编辑性内容进行调整。因此，本文件由等同采用变更为修改采用ISO国际标准，以重新起草法制定国家标准。具体以国际标准ISO 14902:2001《Animal feeding stuffs - Determination of trypsin inhibitor activity of soya products》（英文版）为依据，并依据国家标准GB/T 1.2—2020《标准化工作导则第2部分：以ISO/IEC标准

化文件为基础的标准化文件起草规则》的规定起草标准文本；依据国家标准GB/T 1.2-2020《标准化工作导则第2部分:以ISO/IEC标准化文件为基础的标准化文件起草规则》规范标准格式。此外，此标准编制遵循国家颁布的相关法律法规和相关国家或行业标准的规定。

2、客观性

面向高校、科研院所、各级饲料质检机构、饲料行业大中小型企业等广泛征求意见，同时在国家标准化管理委员会网站公开征求意见，并按照要求合理采纳各相关方意见与建议。

3、协调性

制定的标准与现行相关法规和标准之间能相互协调，避免重复和不必要的差异。

4、易用性

标准编制小组对相关的国内外标准、技术资料进行分析、研究，参考了国内外大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性测定试验的研究方法，同时结合国内检测机构及大豆产品生产企业的质量控制及检验水平的实际情况对该标准进行了适当的修订。此标准的内容便于检测机构和生产企业使用，并且易于被其他标准引用。

(二) 标准主要修订内容及其确定依据

本次国标编制依据标准编制原则，先对国际标准ISO 14902:2001英文版进行中文翻译，对中文翻译稿中发现的问题，开展了以下几个方面修订工作：一是对翻译稿进行文本内容的编辑性修改，使文字表达更符合中文表达习惯；二是对国际标准中省略的内容做了恢复补充，

使翻译稿内容更完整；三是按照国标GB/T 1.1-2020和GB/T 1.2-2020要求，对国标的章条进行了调整和整合，优化文本结构，规范文本内容。以下将从文本技术性内容、结构性内容和编辑性内容三方面对主要修改内容进行说明。

1、文本技术性修改

1.1 对范围的修改

国际标准并未界定标准化对象，缺乏对所涵盖范围的清晰化表述，因此本文件增加条文表述“本文件描述了饲料原料大豆及其加工产品中胰蛋白酶抑制剂活性（TIA）测定的分光光度法”和“本文件适用于饲料原料中大豆及其加工产品中胰蛋白酶抑制剂活性（TIA）的测定”；由于国际标准中“胰蛋白酶抑制剂活性可以用来表示大豆产品的烘烤程度”属于说明性内容，属于附加信息，不属于范围的内容，本文件予以删除。

1.2 对检出限的修改

由于代入国际标准文本的公式计算，检出限为0.5mg/g，但在测定国内部分大豆样品时胰蛋白酶抑制剂活性未检出，为了满足目前市场上大豆加工产品的检测需要，将样本称样量增加到5g，代入文本公式计算可得方法的检出限为0.1mg/g，故而本文件将检出限更改为0.1mg/g。

1.3 对取样方法的修改

国际标准中推荐ISO 6497中的取样方法，并未明确对样品细度的要求，为满足在我国实际市场中对饲用大豆及其加工产品中胰蛋白酶

抑制剂活性的测定，且考虑到符合国标编写规定，本文件将国际标准“7 Sampling”根据GB/T 20195的取样规定修改为“选取有代表性的样品，制备通过0.425 mm试验筛的试样，充分混匀，装入密闭容器，备用”。

1.4 对称样量的修改

国家标准中样品的称样量为1g，由于大豆加工产品如发酵豆粕、酶解豆粕等胰蛋白酶抑制剂活性较低，很大一部分都低于0.5 mg/g，因此增加了称样量到5g，这样大豆加工产品中的胰蛋白酶抑制剂活性基本都能定量测定。

1.5 对试剂配制的修改

根据征求意见，分别对氢氧化钠溶液、盐酸溶液、乙酸溶液的配制过程进行了说明。见5.7-5.12。

1.6 对精密度的修改

由于国际标准“11.1 Repeatability”和“11.2 Reproducibility”是根据ISO5725-1和ISO5725-2关于重复性和再现性的测定方法，基于7个实验室对3个大豆样品（其中2个是大豆，1个是烘烤大豆）胰蛋白酶抑制剂活性测定结果给出的重复性和再现性极限值，考虑到样本量不足，其测定结果对确定饲用大豆的胰蛋白酶抑制剂活性范围参考价值有限，故而删除该章重复性和再现性内容。基于本文件测定方法精密度的要求，规定“在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%”。

2、文本结构性修改

2.1 增加“规范性引用文件”

按照国家标准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》要求，增加“2 规范性引用文件”，将引用的GB/T 6682和GB/T 20195放入此章；本文件所用溶液按GB/T 603的规定制备，故而将GB/T 603也放入此章。

2.2 对样品制备的修改

合并国际标准“7 Sampling”和“8 Preparation of test sample”，按照国家标准 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》要求，在本文件中单独列一章节，列为“7 样品”。

根据实际检测过程的需要，删除国际标准“8 Preparation of test sample”中“试样制备：使用研磨装置（6.9），充分研磨混合样品特征部分”。

2.3 对样品检测次数的修改

国际标准“9.1 Number of determinations”是对样品检测次数的规定，按照国内表述习惯不必单列，本文件将该章节与“8 Preparation of test sample”合并列为“8 试验步骤”。

2.6 对试验报告和附录内容的修改

由于国际标准中第 11.1 章 实验室间测试结果、第 12 章 试验报告和附录 B 呈现了 7 个实验室对 3 个大豆样品的测定结果，是对“11.1 Repeatability”和“11.2 Reproducibility”内容的补充说明，且附录 B 与重复性和再现性中所列表数据部分不符（表 3 与表 B.1 中大豆 1 和大豆 2 的 TIA 值不匹配），为承接本文件对国际标准中第 11

章精密度所作变动，本文件删除了国际标准中第 11.1 章 实验室间测试结果、第 12 章 试验报告、附录图 B 及参考文献的内容。

3、文本编辑性修改

3.1 对标准名称的编辑性修改

与ISO 14902:2001 《动物饲料大豆制品中胰蛋白酶抑制剂活性的测定》相比，由于目前国内还没有将大豆分成动物饲料大豆和其他种类的分类方法，因此本文件将标准名称修改为“饲料原料 大豆及其加工产品中胰蛋白酶抑制剂活性测定”。

3.2 对原理的编辑性修改

国际标准“4 Principle”中未对“用光谱法测定对硝基苯胺的释放量，以此定量分析剩余的胰蛋白酶活性”的具体测定原理做出解释说明，本文件依据NY/T 1103.2-2006 《转基因植物及其产品食用安全检测抗营养素第2部分:胰蛋白酶抑制剂的测定》对实验原理进行了补充，将其具体解释为“胰蛋白酶与苯甲酰-L-精氨酸-对硝基苯胺 (L-BAPA) 发生反应，生成对硝基苯胺，该物质在410nm下有特征吸收。用pH 9.5 溶液提取出的试样中的胰蛋白酶抑制剂可抑制该反应，使吸光度值下降，其下降程度与胰蛋白酶抑制活性成正比。采用分光光度计在410nm 处测定该反应前后的吸光度值，对胰蛋白酶抑制剂活性进行定量。”

3.3 对试剂的编辑性修改

本文件按照先售试剂、配制溶液、标准贮备溶液等顺序逐一给出，所用溶液按GB/T 603的规定制备，因此添加引导语“以下所用溶液按GB/T 603的规定制备”。

国际标准“5.1 Water”中对水的要求是“complying with at least grade 3 in accordance with ISO 3696”，为了符合国标编写规定，对水的要求改为符合国家标准GB/T 6682中三级水的要求。

按照GB/T 603中对溶液配制的规定，本文件对国际标准第5章试剂作如下更改：

将国际标准中5.6对于盐酸溶液的要求由“ $c(\text{HCl}) = 0.01 \text{ mol/L}$ ”改为“5.11 $c(\text{HCl}) = 0.001 \text{ mol/L}$ ”；将国际标准中5.9对于氯化钙盐酸溶液的配制要求更改为“5.13 称取0.735g二水氯化钙（5.2），加入100mL盐酸溶液（5.11）溶解，混匀。用氢氧化钠溶液（5.7）或盐酸溶液（5.6）调节pH值至 3.0 ± 0.1 ”；将国际标准中5.10对于牛胰蛋白酶的要求更改为“5.6 牛胰蛋白酶：Merck No.245791)或性能相当者。其活性测定见9.4，储存在冰箱（6.3）中”，并在本文件下方给出“Merck No.24579¹⁾”脚注，具体表述为“1) Merck No.24579是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对这一产品的认可”；将国际标准中5.11和5.12中“胰蛋白酶”均更改为“牛胰蛋白酶”，并将5.11对胰蛋白酶储备液配制表述更改为“……，称取27.0g，……，在冰箱（6.3）中保存，有效期为5天”；将国际标准中5.16对三羟甲基氨基甲烷-氯化钙缓冲溶液的配制步骤翻译后调整表述，更改为“称取6.05 g 三羟甲基氨基甲烷(5.4)和0.735 g 氯化钙

(5.2), 加入900 mL水溶解、混匀, 用盐酸溶液(5.11)调节pH值至 8.2 ± 0.1 , 加水定容至1000 mL, 混匀”。

3.4 对仪器设备的编辑性修改

根据实际检测过程的需要, 考虑到比色皿、容量瓶、计时器、离心管这些常用设备不需要列入该章中, 本文件将国际标准中上述设备予以删除; 由于国际标准中离心机转速单位“g/min”为重力加速度计量单位, 按照国内离心机规格转速单位应更改为“r/min”, 按照本方法测定需求, 本文件选择规格为“转速 $\geq 4000\text{r/min}$ ”的离心机; 基于称取L-BAPA及胰蛋白酶时称样量较低的考量, 本文件增加增加精度为0.001g和0.0001g的分析天平, 并按照主要仪器设备(如分光光度计、分析天平)在前, 次要的仪器设备在后的编辑原则调整仪器设备的顺序。

3.5 对实验步骤的编辑性修改

本文件将国际标准“9.2 Sample extraction”译为样品提取; 为了简化实际检测过程且考虑到用水稀释样品提取液过程中温度对样品提取结果的影响差异不显著, 本文件将国际标准“9.2 Sample extraction”中“Place in the refrigerator the quantity of water needed for making up the sample extracts”与“dilute to the mark with water from the refrigerator and mix”部分删除, 将此条文整段列为8.1, 条标题为“提取”, 内容调整为“平行做两份试验。称取1g(精确至0.001g)制备好的试样(7)于100 mL 锥形瓶中, 加入50 mL氢氧化钠溶液(5.2), 摇匀。用1 mol/L盐酸溶液(5.4)和0.1 mol/L 盐酸溶液(5.5)调节pH 至 9.5 ± 0.1 ,

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/737034201026010005>