

ICS 65.120
CCS B 46

团 体 标 准

T/CFIAS 6013—2024

饲料原料中膳食纤维的测定

Determination of dietary fiber in feed ingredients

2024-12-31 发布

2024-12-31 实施

中国饲料工业协会 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专利的责任。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：湖北国正质量技术服务有限公司、浙江国正检测技术有限公司、武汉轻工大学、安徽赛如分析检测科技有限公司、福建倍思达生物有限公司、杭州康德权饲料有限公司、福建省厦门市环境监测中心站。

本文件主要起草人：许丰、杨巧玲、代兵、李雷、蒋宗莉、丁斌鹰、李俊辉、臧爱香、黄灿晖、黄庆祥、陈仕怡、吴松树、李浙烽、侯嘉、刘丽华、严天成、陈月莹、刘静怡。

饲料原料中膳食纤维的测定

1 范围

本文件规定了饲料原料中膳食纤维的测定方法。

本文件适用于植物源性饲料原料中膳食纤维(不包括部分或全部溶于乙醇的低聚糖、抗性麦芽糊精、抗性淀粉等)的测定。

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 6432 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法

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 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

膳食纤维 dietary fiber

植物源性饲料中的非淀粉多糖类碳水化合物聚合物,包括纤维素、半纤维素、果胶、木质素等。

4 原理

试样经酶解消化去除蛋白质和淀粉后,乙醇沉淀、抽滤,残渣用乙醇和丙酮洗涤后干燥,扣除残渣中的粗蛋白质和粗灰分。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水: GB/T 6682, 三级。

5.2 丙酮。

5.3 78%乙醇溶液: 取 821 mL 95%乙醇,用水稀释至 1 L,混匀。

5.4 240 g/L 氢氧化钠溶液: 称取 24 g 氢氧化钠,用水溶解至 100 mL,混匀。

5.5 40 g/L 氢氧化钠溶液: 称取 4 g 氢氧化钠,用水溶解至 100 mL,混匀。

5.6 重铬酸钾洗液: 称取 100 g 重铬酸钾,用 200 mL 水溶解,加入 1 800 mL 浓硫酸混合。

5.7 MES-TRIS 缓冲液 (0.05 mol/L): 称取 19.52 g 2-(N-吗啉代)乙烷磺酸和 12.2 g 三羟甲基氨基甲烷,用 1.7 L 水溶解(根据室温用 240 g/L 氢氧化钠溶液调 pH, 20 °C 时调 pH 为 8.3, 24 °C 时调 pH 为 8.2, 28 °C 时调 pH 为 8.1; 20 °C~28 °C 之间其他室温用插入法校正 pH),加水稀释至 2 L。

5.8 乙酸溶液 (3 mol/L): 取 172 mL 冰乙酸,加入 700 mL 水,混匀后用水定容至 1 L。

5.9 盐酸溶液 (1 mol/L): 取 8.33 mL 盐酸,用水稀释至 100 mL,混匀。

5.10 盐酸溶液 (2 mol/L): 取 167 mL 盐酸,用水稀释至 1 L,混匀。

5.11 热稳定 α -淀粉酶: 0 °C~5 °C 保存,酶的活性要求及判定标准详见附录 A。

5.12 淀粉葡萄糖苷酶: 0 °C~5 °C 保存,酶的活性要求及判定标准详见附录 A。

5.13 蛋白酶: 0 ℃~5 ℃保存, 酶的活性要求及判定标准详见附录A。

5.14 蛋白酶溶液(50 mg/mL): 称取2.5 g蛋白酶(5.13), 用50 mL MES-TRIS缓冲液(5.7)配成每毫升含50 mg的蛋白酶溶液, 涡旋振荡5 min。临用现配。使用前于0 ℃~5 ℃暂存。

酸洗硅藻土: 称取硅藻土约200 g, 置于1 L烧杯中, 加入600 mL的2 mol/L盐酸溶液(5.10)浸泡过夜, 过滤, 用水洗至滤液为中性, 置于550 ℃±20 ℃马弗炉中灼烧后备用。

6 仪器设备

6.1 分析天平: 精度0.1 mg。

6.2 马弗炉: 控温范围550 ℃±20 ℃。

6.3 干燥箱: 控温范围103 ℃±2 ℃。

6.4 pH计: 精度±0.1。

6.5 恒温振荡水浴箱: 控温范围60 ℃~100 ℃。

6.6 坩埚: G2玻璃砂芯坩埚。

注: 清洗后的坩埚在马弗炉中550 ℃±20 ℃灰化6 h, 炉温降至130 ℃以下取出, 于重铬酸钾洗液(5.6)中室温浸泡2 h, 用水冲洗干净, 再用15 mL丙酮(5.2)冲洗后风干。用前, 加入约1.0 g酸洗硅藻土(5.15), 103 ℃±2 ℃烘干至恒重, 取出, 置于干燥器中, 冷却至室温迅速称量。记录处理后坩埚质量(mG), 精确到0.1 mg。

7 样品

按GB/T 20195制备样品。至少200 g, 充分混匀, 粉碎使其全部通过0.425 mm的分析筛, 装入密闭容器中, 备用。

注1: 当粗脂肪含量≥10%, 需进行脱脂处理, 处理方式详见附录B。

注2: 一般情况下试样无需脱糖处理, 如试样因糖含量较高导致黏度过大, 影响后续酶解、抽滤效果, 宜采用脱糖处理, 处理方式详见附录B。

8 试验步骤

8.1 试样溶液制备

平行做两份试验。每份试验准确称取2份试样(分别为m₁和m₂)约1 g±0.02 g(精确至0.000 1 g), 分别置于400 mL~600 mL高脚烧杯中, 加入0.05 mol/L的MES-TRIS缓冲液(5.7)40 mL, 搅拌均匀至试样完全分散在缓冲液中。

8.2 酶解

8.2.1 热稳定α-淀粉酶酶解

向每份试样液中分别加入50 μL热稳定α-淀粉酶液(5.11)缓慢搅拌, 加盖铝箔, 置于95 ℃~100 ℃恒温振荡水浴箱中持续振摇, 当温度升至95 ℃开始计时, 反应35 min。将烧杯取出, 冷却至60 ℃, 打开铝箔盖, 用刮勺轻轻将附着于烧杯内壁的环状物以及烧杯底部的胶状物刮下, 用10 mL水冲洗烧杯壁和刮勺。

注: 如试样中抗性淀粉含量较高(>40%), 可延长热稳定α-淀粉酶酶解时间90 min, 如必要也可另加入10 mL二甲基亚砜帮助淀粉分散。

8.2.2 蛋白酶酶解

将每份试样液(8.2.1)置于60 ℃±1 ℃恒温振荡水浴箱中, 向每个烧杯加入100 μL蛋白酶溶液(5.14), 盖上铝箔, 开始计时, 持续振摇, 反应30 min。打开铝箔盖, 边搅拌边加入5 mL 3 mol/L乙酸溶液(5.8), 控制试样温度保持在60 ℃±1 ℃。用40 g/L氢氧化钠溶液(5.5)或1 mol/L盐酸溶液(5.9)调节试样液pH至4.5±0.2。

注: 应在60 ℃±1 ℃时调pH, 因为温度降低会使pH升高。同时注意进行空白样液的pH测定, 保证空白样和试样液的pH一致。

8.2.3 淀粉葡萄糖苷酶酶解

边搅拌边向每个烧杯中加入100 μ L 淀粉葡萄糖苷酶液(5.12)，盖上铝箔，继续于60 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C恒温振荡水浴箱中持续振摇，反应30 min。

8.3 膳食纤维的测定

8.3.1 沉淀

向每份试样酶解液(8.2.3)中,按乙醇与试样液体积比4:1的比例加入预热至60 °C±1 °C的95%乙醇(预热后体积约为225 mL),取出烧杯,盖上铝箔,于室温条件下沉淀1 h。

8.3.2 抽濾

取已经处理并恒重的坩埚(6.6),用15 mL 78%乙醇(5.3)润湿硅藻土并展平,接上真空抽滤装置,抽去乙醇使坩埚中硅藻土平铺于滤板上。将试样乙醇沉淀液(8.3.1)缓慢转移入坩埚中抽滤,用刮勺和78%乙醇(5.3)将高脚烧杯中所有残渣转至坩埚中。用78%乙醇(5.3)15 mL洗涤残渣2次。

8. 3. 3 残渣测定

8.3.3.1 残渣测定: 用 95% 乙醇 15 mL 洗涤残渣 2 次, 丙酮 15 mL 洗涤残渣 2 次, 抽滤去除洗涤液后, 将坩埚连同残渣在 103 °C ± 2 °C 烘干至恒重。将坩埚置干燥器中冷却至室温迅速称量, 称量包括处理后坩埚质量及残渣质量 (m_R), 精确至 0.1 mg。减去处理后坩埚质量, 计算试样残渣质量 (m_1 和 m_2)。

8.3.3.2 粗蛋白质质量的测定：取1份试样残渣（R1）按GB/T 6432消煮、蒸馏、滴定，根据消耗盐酸标准滴定溶液的体积计算粗蛋白质质量（ m ）。

8.3.3.3 粗灰分质量的测定：取另1份试样残渣（R2）按GB/T 6438测定灰化后粗灰分质量（m）。

9 试验数据处理

9.1 试样残渣质量 m_R , 单位以克 (g) 表示, 按式 (1) 计算:

式中：

m_{GR} ——坩埚及残渣质量, 单位为克 (g);

m_G ——坩埚质量, 单位为克 (g)。

9.2 试样中膳食纤维的含量以质量分数 X 计, 数值以质量分数 (%) 表示, 按式 (2) 计算:

式中 i

m_{P1} 、 m_{P2} ——试样残渣质量, 单位为克 (g);

m_p ——试样残渣中粗蛋白质质量, 单位为克 (g) ;

m_4 ——试样残渣中粗灰分质量, 单位为克 (g);

m_1, m_2 ——试样称量质量, 单位为克 (g);

f ——试样制备过程中质量校正因子，按照附录 B 计算。

注：如果试样没有经过脱脂、脱糖干燥处理， $f=1$ 。

10 精密度

在重复性条件下获得的2次独立测定结果应符合以下要求：

在重复性条件下获得的2次独立测定结果应符合，膳食纤维含量<30%时，其绝对差值不大于1.5%。

膳食纤维含量 $\leq 30\%$ 时，其绝对差值不大于 1.5% ；膳食纤维含量为 $\geq 30\%$ 时，其绝对差值不大于其算术平均值的 5% 。

附录 A
(规范性)
酶活性要求及判定标准

A. 1 酶活性要求

A. 1. 1 热稳定 α -淀粉酶

以淀粉为底物用Nelson/Somogyi还原糖测试的淀粉酶活性: 10 000 U/mL±1 000 U/mL。1 U表示在40 °C, pH 6.5环境下, 每分钟释放1 μ mol还原糖所需要的酶量。

A. 1. 2 蛋白酶

以酪蛋白为底物测试的蛋白酶活性: 300 U/mL~400 U/mL。1 U表示在40 °C, pH 8.0环境下, 每分钟从可溶性酪蛋白中水解出可溶于三氯乙酸的1 μ mol酪氨酸所需要的酶量。

A. 1. 3 淀粉葡萄糖苷酶

以淀粉/葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测试的淀粉葡萄糖苷酶活性: 2 000 U/mL~3 300 U/mL。1 U表示在40 °C, pH 4.5环境下, 每分钟释放1 μ mol葡萄糖所需要的酶量。

A. 2 酶活性判定标准

当酶的生产批次改变或最长使用间隔超过6个月时, 应按表A. 1所列标准物进行校准, 以确保所使用的酶达到预期的活性, 不受其他酶的干扰。

表A. 1 酶活性测定标准

底物标准	测试活性	标准质量 g	预期回收率 %
柑橘果胶	果胶酶	0.1~0.2	95~100
阿拉伯半乳聚糖	半纤维素酶	0.1~0.2	95~100
β -葡聚糖	β -葡聚糖酶	0.1~0.2	95~100
小麦淀粉	α -淀粉酶+淀粉葡萄糖苷酶	1.0	<1
玉米淀粉	α -淀粉酶+淀粉葡萄糖苷酶	1.0	<1
酪蛋白	蛋白酶	0.3	<1

附录 B (规范性) 样品脱脂、脱糖处理

B. 1 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

B. 1.1 水: GB/T 6682, 三级。

B. 1.2 石油醚: 沸程 30 °C~60 °C。

B. 1. 3 85%乙醇溶液: 取895 mL 95%乙醇, 用水稀释至1 L, 混匀。

B. 2 仪器设备

B. 2. 1 真空干燥箱: 控温范围 $70\text{ }^{\circ}\text{C}\pm1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

B. 2.2 分析天平: 精度1 mg。

B. 3 试验步骤

B. 3. 1 脱脂

称取试样约10 g (m, 精确至0.001 g), 置于漏斗中, 加入100 mL石油醚(B. 1.2)冲洗, 重复3次。将试样混匀后置于70 °C±1 °C真空干燥箱内干燥至恒重。将干燥后试样转至干燥器中, 待试样温度降到室温后称量样品质量 (m), 精确至0.001 g。根据脱脂干燥处理后试样质量, 计算试样质量校正因子 (f)。试样粉碎均匀, 置于干燥器中待用。

B. 3. 2 脱糖

称取试样约10 g (m, 精确至0.001g), 置于漏斗中, 加入100 mL 85%乙醇溶液(B.1.3)冲洗, 弃乙醇溶液, 重复3次。将试样混匀后置于70 °C±1 °C真空干燥箱内干燥至恒重。将干燥后试样转至干燥器中, 待试样温度降到室温后称量样品质量 (m_b), 精确至0.001 g。根据脱糖干燥处理后试样质量, 计算试样质量校正因子 (f)。试样粉碎均匀, 置于干燥器中待用。

B. 4 试验数据处理

试样制备中质量校正因子 f , 按式 (B.1) 计算:

式中：

m_c ——试样制备前试样质量, 单位为克 (g);

m_D ——试样制备后试样质量, 单位为克 (g)。

T/CFIAS 6013—2024