



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116337791 B

(45) 授权公告日 2023.08.15

(21) 申请号 202310626079.8	CN 114414513 A, 2022.04.29
(22) 申请日 2023.05.31	CN 109142551 A, 2019.01.04
(65) 同一申请的已公布的文献号	CN 102033064 A, 2011.04.27
申请公布号 CN 116337791 A	CN 110927154 A, 2020.03.27
(43) 申请公布日 2023.06.27	US 2003021774 A1, 2003.01.30
(73) 专利权人 北京挑战生物技术有限公司	US 2005058747 A1, 2005.03.17
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街	CN 102520155 A, 2012.06.27
12号综合科研楼3层313室	CN 104215604 A, 2014.12.17
专利权人 天津博菲德科技有限公司	CN 110879206 A, 2020.03.13
(72) 发明人 暴宁 胡小龙 李爽 李阳	FR 2854886 A1, 2004.11.19
张广民 李勇 雷恒 蔡辉益	WO 2021148606 A1, 2021.07.29
(74) 专利代理机构 北京专赢专利代理有限公司	CN 109813832 A, 2019.05.28
11797	CN 106434850 A, 2017.02.22
专利代理师 刘梅	WO 2005040207 A1, 2005.05.06
(51) Int.Cl.	CN 109825485 A, 2019.05.31
G01N 21/31 (2006.01)	CN 106483092 A, 2017.03.08
G01N 1/28 (2006.01)	CN 107831124 A, 2018.03.23
(56) 对比文件	CN 104181116 A, 2014.12.03
PH 9342 A, 1975.09.23	US 2014370566 A1, 2014.12.18
CN 106323964 A, 2017.01.11	CN 102424803 A, 2012.04.25
RU 2680833 C1, 2019.02.28	
WO 9000201 A1, 1990.01.11	

(续)

审查员 朱滢滢

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

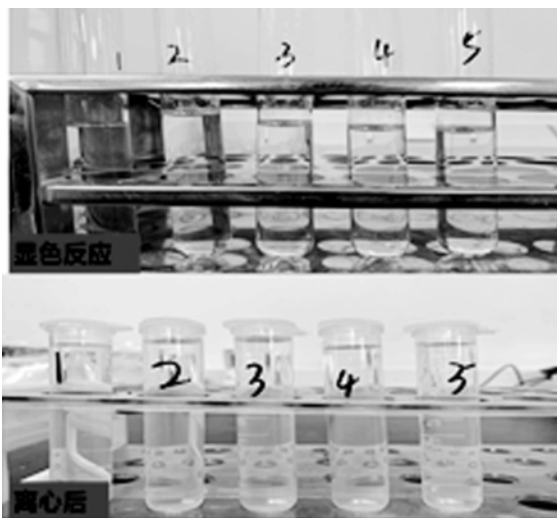
(54) 发明名称

一种饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法,按体外法将饲料原料样品消化后,将消化液离心获得上清液,取得的上清液经过抗干扰处理后,获得的待测液再按体外法进行磷含量的检测。本发明提出的饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法,是对现行团体标准《植酸酶磷释放率的分光光度法》T/CBFIA 02002-2020所述方法存在缺陷的优化,操作简单,重复性和准确度高,为快速筛选可以大规模商用的植酸酶提供了有力的保障。

CN 116337791 B



[接上页]

(56) 对比文件

王攀攀 等. “不同植酸磷/ 非植酸磷比例对

肉鸡生长性能和营养物质利用率的影响”. 科学技术. 2020, 第56卷(第11期), 全文.

1. 一种饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法,其特征在于,按体外法将饲料原料样品消化后,将消化液离心获得上清液,取得的上清液经过抗干扰处理后,获得的待测液再按体外法进行磷含量的检测,所述体外法为团体标准《T/CBFIA 02002-2020植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》记载的方法;

所述抗干扰处理为在上清液中加入体积比为四倍的浓度为10%的硝酸水溶液,室温震荡30min,然后离心获得待测液;

或,所述抗干扰处理为在上清液中加入体积比为十分之一的浓度为10%的SDS溶液和体积比为四分之一的浓度为1mol/L的KCL溶液,混匀后离心并过0.22 μ m水系膜获得待测液;

或,所述抗干扰处理为在上清液中加入体积比为四倍的浓度为10%的硝酸水溶液,室温震荡30min,然后离心,取本次经硝酸水溶液处理并离心分离的上清液,加入体积比为十分之一的浓度为10%的SDS溶液和体积比为四分之一的浓度为1mol/L的KCL溶液,混匀后再次离心并过0.22 μ m水系膜获得待测液。

2. 根据权利要求1所述饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法,其特征在于,所述消化液于8000转/分钟离心10分钟。

3. 根据权利要求1或2任一所述饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法,其特征在于,所述抗干扰处理中的离心参数为4000转/分钟离心10分钟。

一种饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及饲料酶制剂评估领域,具体涉及一种饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法。

背景技术

[0002] 磷是动物必需的矿物元素之一。植物中的磷主要以植酸磷的形式储存,植酸磷只有通过植酸酶降解为无机磷才能被动物吸收。

[0003] 植酸酶是能催化植酸及其盐类水解为肌醇与磷酸盐的一类酶的总称,学名为六磷酸肌醇水解酶。植酸酶具有特殊的空间结构,能够分离植酸分子中的磷,将植酸水解为肌醇和无机磷,同时释放出与植酸结合的其它营养物质。植酸酶广泛存在与动物、植物和微生物中。因此植物饲料原料中的植酸磷的利用需要植物性饲料原料和动物肠道内源植酸酶以及添加外源植酸酶被加以利用,如何评价植酸酶酶解饲料原料后有效磷含量至关重要。

[0004] 目前饲料磷生物学效价的评定方法主要有体内法和体外法。体内法即动物试验费力、费时,系统误差和偶然误差因素多。体外法具有快速、简便、费用低等优点,现有诸多研究报道。体外法在模拟总结生长猪消化道主要消化酶变异规律的基础上,根据杜×长×大三元杂交生长猪在典型饲粮条件下的酶谱与水解环境,模拟动物消化道内环境,完成模拟生长猪饲料在单胃动物仿生消化系统消化过程,下机后的水解产物通过处理操作完成测定。而体外法中基于饲料仿生消化测定的方法更受青睐,然而体外法的关键点在于,消化液中有有效磷含量即其游离的无机磷含量的测定,其难点在于如何对消化液进行处理,去除干扰因子,使得无机磷检测更加准确。现有技术中,一般的后处理方法参考团体标准《植酸酶磷释放率的分光光度法》T/CBFIA 02002-2020,但是经大量试验发现该方法容易受饲料原料本身的特性干扰,导致结果的批内和批间重复性变异较大,然而如何选择有效的植酸酶产品对于饲料厂而言至关重要,因此急需对现有后处理方法进行改进以为畜牧行业提供一个更加快速、准确、有效的评估方法。

发明内容

[0005] 为了解决以上问题,本发明提出一种植酸酶酶解饲料原料后中植酸磷释放率的体外检测方法。

[0006] 本发明提出的饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法,按体外法将饲料原料样品消化后,将消化液离心获得上清液,取得的上清液经过抗干扰处理后,获得的待测液再按体外法进行磷含量的检测。

[0007] 进一步,所述抗干扰处理为在上清液中加入体积比为四倍的浓度为10%的硝酸水溶液,室温震荡30min,然后离心获得待测液。

[0008] 进一步,所述抗干扰处理为在上清液中加入体积比为十分之一的浓度为10%的SDS溶液和体积比为四分之一的浓度为1mol/L的KCL溶液,混匀后离心并过0.22μm水系膜获得待测液。

[0009] 进一步,所述抗干扰处理为在上清液中加入体积比为四倍的浓度为10%的硝酸水溶液,室温震荡30min,然后离心,取本次经硝酸水溶液处理并离心分离的上清液,加入体积比为十分之一的浓度为10%的SDS溶液和体积比为四分之一的浓度为1mol/L的KCL溶液,混匀后再次离心并过0.22 μ m水系膜获得待测液。

[0010] 进一步,所述体外法为团体标准《T/CBFIA 02002-2020植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》记载的方法。

[0011] 进一步,所述消化液于8000转/分钟离心10分钟。

[0012] 进一步,所述抗干扰处理中的离心参数为4000转/分钟离心10分钟。

[0013] 本发明提供的饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法应用在饲料检测中。

[0014] 本发明的有益效果如下:

[0015] 1、本发明提出的饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法,是对现行团体标准《植酸酶磷释放率的分光光度法》T/CBFIA 02002-2020所述方法存在缺陷的优化。

[0016] 2、本发明发现,现行团体标准测定植酸酶对饲料原料中无机磷释放效果的结果存在批内和批间重复性变异较大的问题,而这个问题是由于检测中蛋白质干扰造成的,经过抗干扰处理能有效解决蛋白质对样品中无机磷含量测定的干扰影响,获得重复性和准确度高的结果,并在现有可行的消除蛋白质干扰的方法中确定了两种效果好的方法,其一为在上清液中加入体积比为四倍的浓度为10%的硝酸水溶液,室温震荡30min,然后离心获得待测液;其二为在上清液中加入体积比为十分之一的浓度为10%的SDS溶液和体积比为四分之一的浓度为1mol/L的KCL溶液,混匀后离心并过0.22 μ m水系膜获得待测液;并通过实验验证将这两种方法叠加使用,即所述抗干扰处理为在上清液中加入体积比为四倍的浓度为10%的硝酸水溶液,室温震荡30min,然后离心,取本次经硝酸水溶液处理并离心分离的上清液,加入体积比为十分之一的浓度为10%的SDS溶液和体积比为四分之一的浓度为1mol/L的KCL溶液,混匀后再次离心并过0.22 μ m水系膜获得待测液,获得的结果准确度更高,重复性更好。

[0017] 3、本发明的方法操作简单,重复性和准确度高。为饲料禁抗环境下饲料企业快速筛选可以大规模商用的植酸酶提供了有力的保障。

附图说明

[0018] 图1为实施例2对照组待测液的检测结果;

[0019] 图2为实施例2试验组待测液的检测结果。

具体实施方式

[0020] 以下结合实施例对本发明作进一步说明。

[0021] 实施例1以玉米豆粕型日粮为底物采用常规方法测定植酸磷释放率

[0022] 1)底物样品为玉米豆粕型日粮(玉米:豆粕=3:1,粉碎过筛60目),采用团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》方法将底物样品进行消化,消化结束后得到消化液;

[0023] 2)消化后后处理方法:

[0024] 消化结束后将锥形瓶内的消化液用超纯水冲洗干净,无损失地转移到200mL容量

瓶中,用超纯水准确定容至刻度,摇匀备用。取容量瓶中的消化液10mL于台式离心机中8000r/min离心10min,得待测液;

[0025] 3)将处理后的待测液按照团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》的方法进行吸光值的检测、数据处理和计算,试验结果见表1。

表 1 饲料植酸磷释放率 (%)

分组	1	2	3	变异系数%
植酸磷释放率 (%)	55.62	60.14	64.39	7.30

注:单位为%,1~3代表3次平行试验。

[0027] 4)试验结论:经过试验结果显示,在加入显色剂后静置10分钟后显色液呈浑浊不透明状,吸光值异常,离心后有沉淀,结果异常,变异系数为7.30%,测定结果平行性差,表明该方案受某种因素的干扰导致测定值不准确。经分析,消化液中存在的蛋白质可能是影响测定结果的因素之一。

[0028] 实施例2蛋白质组分对植酸磷释放率测定影响的评估试验(以OD值为评价指标)

[0029] 1)磷标准液配制及标准曲线:同团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》;

[0030] 2)乙酸缓冲溶液1的配制:同团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》;

[0031] 3)乙酸缓冲溶液2的配制:同团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》,其中包含牛血清蛋白;

[0032] 4)操作步骤:吸取4mL磷标准溶液于50mL容量瓶中,对照组使用乙酸缓冲溶液2,试验组使用乙酸缓冲溶液1分别定容至50mL,摇匀,常温下放置 10 分钟以上,分别获得待测液;

[0033] 5)将上述处理后的对照组待测液和试验组待测液分别按照团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》的方法进行吸光值的检测,试验结果见表2和图1、图2。

[0034] 图1为对照组待测液的检测结果,图2为试验组待测液的检测结果。

表 2 测定 OD 值

分组	1	2	3	4	5
对照组	0.044	0.087	0.094	0.169	0.083
试验组	0.356	0.355	0.355	0.357	0.356

注:1~5代表5次平行试验。

[0036] 6)试验结论:由图1和图2可见,对照组在加入乙酸缓冲液2定容后呈浑浊不透明状,吸光值异常,将显色液离心后有沉淀析出,离心后OD值大幅降低,结果明显偏低且平行性差,而试验组没有沉淀析出,结果平行性好。由于对照组使用的乙酸缓冲液2中含有牛血

清蛋白,而试验组使用的乙酸缓冲液1不含牛血清蛋白,表明在体外法检测无机磷含量时,消化液中无机磷的含量会受蛋白质的干扰导致测定值不准确。而植酸磷释放率的评估需要依据无机磷的含量,无机磷测定的不准确会影响到植酸磷释放率的准确评估。因此本发明旨在消除消化液中蛋白质对饲料中无机磷含量的干扰。

[0037] 实施例3 不同去除消化液中的蛋白质的方法的筛选

[0038] A组、采用SDS-KCL对消化液进行后处理方案的评估试验

[0039] 1)底物样品为玉米豆粕型日粮(玉米:豆粕=3:1,粉碎过筛60目),消化方法同实施例1,消化结束后得到消化液;

[0040] 2)消化后处理方法:

[0041] 消化结束后将锥形瓶内的消化液用超纯水冲洗干净,无损失地转移到200mL容量瓶中,用超纯水准确定容至刻度,摇匀备用。取容量瓶中的消化液10mL于台式离心机中8000r/min离心10min,后取出4mL离心消化液的上清液,添加10%SDS溶液和 KCL (1mol/L)溶液(添加量见表3),混匀后于4000r/min离心10min,上清液过0.22 μ m水系膜,得待测液。

表3 SDS 和 KCL 添加量(单位: mL)

分组	10%SDS	KCL(1mol/L)
A-1	1	0
A-2	1	0.4
A-3	0.4	0.8
A-4	0.4	1
A-5	0.2	1.2
A-6	0	1

[0042] 3)将处理后的待测液按照团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》的方法进行吸光值的检测、数据处理和计算,试验结果见表8。

[0044] B组、水浴加热后处理方案的评估试验

[0045] 1)底物样品为玉米豆粕型日粮(玉米:豆粕=3:1,粉碎过筛60目),消化方法同实施例1,消化结束后得到消化液;

[0046] 2)消化后处理方法:

[0047] 消化结束后将锥形瓶内的消化液用超纯水冲洗干净,无损失地转移到200mL容量瓶中,用超纯水准确定容至刻度,摇匀备用。取容量瓶中的消化液10mL于台式离心机中8000r/min离心10min,取上清液5mL于不同温度水浴中加热10min,冷却得待测液,见表4。

表 4 不同温度分组

分组	温度 (°C)
B-1	70
B-2	80
B-3	90
B-4	100

[0049] 3) 将处理后的待测液按照团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》的方法进行吸光值的检测、数据处理和计算, 试验结果见表8。

[0050] C组、10%硝酸处理方案的评估试验

[0051] 1) 底物样品为玉米豆粕型日粮(玉米:豆粕=3:1, 粉碎过筛60目), 消化方法同实施例1, 消化结束后得到消化液;

[0052] 2) 消化后处理方法:

[0053] 消化结束将锥形瓶内的消化液用超纯水冲洗干净, 无损失地转移到200mL容量瓶中, 用超纯水准确定容至刻度, 摇匀备用。取容量瓶中的消化液10mL于台式离心机中8000r/min离心10min, 取2.5mL上清液加入不同量的10%硝酸水溶液, 室温震荡30min, 取出后于台式离心机中4000r/min离心10min, 得待测液, 见表5。

表 5 不同处理分组

分组	10%硝酸水溶液 (mL)
C-1	1
C-2	2
C-3	5
C-4	10

[0055] 3) 将处理后的待测液按照团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》的方法进行吸光值的检测、数据处理和计算, 试验结果见表8。

[0056] D组、3%三氯乙酸处理方案的评估试验(参考《植酸酶磷释放率的分光光度法》T/CBFIA 02002-2020)

[0057] 1) 底物样品为玉米豆粕型日粮(玉米:豆粕=3:1, 粉碎过筛60目), 消化方法同实施例1, 消化结束后得到消化液;

[0058] 2) 消化后处理方法:

[0059] 消化结束后将锥形瓶内的消化液用水冲洗干净,无损失地转移到200mL容量瓶中,用超纯水准确定容至刻度,摇匀备用。取容量瓶中的消化液10mL于台式离心机中8000r/min离心10min,取2.5mL上清液加入不同量的3%三氯乙酸,室温震荡30min,取出后于台式离心机中4000r/min离心10min,得待测液。见表6。

表 6 不同处理分组

分组	3%三氯乙酸水溶液 (mL)
D-1	1
D-2	2
D-3	5
D-4	10

[0061] 3)将处理后的待测液按照团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》的方法进行吸光值的检测、数据处理和计算,试验结果见表8。

[0062] E组、甲醇处理方案的评估试验

[0063] 1)底物样品为玉米豆粕型日粮(玉米:豆粕=3:1,粉碎过筛60目),消化方法同实施例1,消化结束后得到消化液;

[0064] 2)消化后处理方法:

[0065] 消化结束后将锥形瓶内的消化液用水冲洗干净,无损失地转移到200mL容量瓶中,用超纯水准确定容至刻度,摇匀备用。取容量瓶中的消化液10mL于台式离心机中8000r/min离心10min,取2.5mL上清液加入不同量甲醇,室温震荡30min,取出后于台式离心机中4000r/min离心10min,得待测液。见表7。

表 7 不同处理分组

分组	甲醇 (mL)
E-1	1
E-2	2
E-3	5
E-4	10

[0067] 3)将处理后的待测液按照团体标准《T/CBFIA 02002-2020 植酸酶磷释放率的测定 分光光度法》的方法进行吸光值的检测、数据处理和计算,试验结果见表8。

[0068] 评估结果

[0069] 根据以上不同处理方法,结果汇总如下表8。

表 8 不同处理方案的植酸磷释放率 (%)

组别	分组	1	2	3	变异系数%
A	A-1	50.15	55.89	51.47	5.72
	A-2	64.89	66.79	68.27	2.54
	A-3	68.80	69.43	68.11	0.95
	A-4	69.82	69.94	70.17	0.25
	A-5	62.45	64.68	65.97	2.77
	A-6	47.85	51.07	54.62	6.62
B	B-1	48.35	51.49	53.67	5.23
	B-2	54.29	56.79	58.27	3.56
	B-3	58.80	59.43	63.11	3.90
	B-4	62.82	65.74	60.97	3.81
C	C-1	58.35	59.49	63.67	4.63
	C-2	62.29	64.79	60.27	3.63
	C-3	62.80	65.43	66.11	2.70
	C-4	67.82	68.24	68.37	0.42
D	D-1	61.75	59.89	66.67	5.58
	D-2	65.29	62.79	60.27	4.00
	D-3	63.8	68.43	66.11	3.50
	D-4	68.82	66.71	69.87	2.35
E	E-1	60.32	57.89	54.37	5.20
	E-2	61.29	62.70	58.29	3.70
	E-3	62.80	65.45	64.12	2.06
	E-4	62.82	65.77	68.87	4.59

[0071] 注:单位为%,1~3代表3次平行试验。

[0072] 试验结果显示,按照A-4组10%SDS0.4mL, KCL (1mol/L) 1mL时变异系数最小,为0.23%,次之为C-4组,变异系数为0.42%。

[0073] 优化组:硝酸水溶液和SDS溶液和KCL溶液叠加处理消化液中的蛋白质方案的评估试验

[0074] 由于上述筛选方法中,采用C-4组10%硝酸水溶液10mL和0.4mL10%SDS溶液和1mL

(1mol/L) KCL溶液处理消化液中的蛋白质两种方式对检测结果的平行性和稳定性效果较好,因此,将两种方法叠加采用,以得到检测方法的进一步优化。

[0075] 1)底物样品为玉米豆粕型日粮(玉米:豆粕=3:1,粉碎过筛60目),消化方法同实施例1,消化结束后得到消化液;

[0076] 2)消化后处理方法:

[0077] 消化结束后将锥形瓶内的消化液用水冲洗干净,无损失地转移到200mL容量瓶中,用超纯水准确定容至刻度,摇匀备用。取容量瓶中的消化液10mL于台式离心机中8000r/min离心10min,取上清液2.5mL加入10mL10%硝酸水溶液,室温震荡30min,取出后于台式离心机中4000r/min离心10min;后取出4mL经硝酸水溶液处理并离心分离的上清液添加0.4mL10% SDS溶液和1mL(1mol/L) KCL溶液,混匀后4000r/min离心10min,过0.22 μ m水系膜,得待测液。

[0078] 3)将处理后的待测液按照团体标准的方法进行吸光值的检测,数据处理和计算,试验结果见表9。

表9 不同处理方案的植酸磷释放率(%)

分组	1	2	3	变异系数%
10%硝酸水溶液 10mL	67.82	68.24	68.37	0.42
[0079] 0.4mL10%SDS 溶液和 1mL(1mol/L) KCL	69.82	69.94	70.17	0.25
10%硝酸水溶液 10mL +0.4mL10%SDS 溶液和 1mL(1mol/L) KCL	70.15	69.97	70.02	0.13

注:单位为%, 1~3 代表3次平行试验。

[0080] 试验结果显示,采用10%硝酸水溶液10mL和0.4mL10%SDS溶液和1mL(1mol/L) KCL溶液处理消化液中的蛋白质,效果更优,变异系数仅为0.13%。

[0081] 综合以上对消化液中蛋白质的抗干扰处理方法可知,通过不同参数和处理方法的筛选,采用10%硝酸水溶液10mL和0.4mL10%SDS溶液和1mL(1mol/L) KCL溶液处理消化液中的蛋白质两种方式叠加采用,对检测方法的效果最优,因此选择该处理方法做为最终的消化液蛋白质去除方法,克服了干扰因子对检测结果的平行性和稳定性的不良影响。

[0082] 实施例4 以豆粕、棉粕、葵花籽粕、米糠粕、菜粕种蛋白型饲料原料为底物的植酸磷释放率的试验,以检测方法的有效性。

[0083] 1)底物样品豆粕、棉粕、葵花籽粕、米糠粕、菜粕(粉碎过筛60目),消化方法同实施例1,消化结束后得到消化液;

[0084] 2)消化后处理方法:

[0085] 消化结束后将锥形瓶内的消化液用水冲洗干净,无损失地转移到200mL容量瓶中,用超纯水准确定容至刻度,摇匀备用。取容量瓶中的消化液10mL于台式离心机中8000r/min离心10min,取上清液2.5mL加入10mL10%硝酸水溶液,室温震荡30min,取出后于台式离心机

中4000r/min离心10min。后取出4mL离心后消化液添加0.4mL10%SDS溶液和1mL (1mol/L) KCL溶液,混匀后4000r/min离心10min,过0.22 μ m水系膜,得待测液。

[0086] 3) 将处理后的待测液按照团体标准的方法进行吸光值的检测,数据处理和计算,试验结果见表10。

表 10 植酸磷释放率汇总表

饲料	植酸磷释放率%	变异系数%
豆粕	49.73 \pm 0.35	0.70
棉粕	81.10 \pm 0.18	0.22
菜粕	43.14 \pm 0.22	0.51
葵花籽粕	67.40 \pm 0.39	0.60
米糠粕	41.84 \pm 0.15	0.36

[0088] 4) 试验结论:蛋白类饲料按照本发明优选的方案进行测定后,变异系数分别为0.7%、0.22%、0.51%、0.60%、0.36%,且方法平行性和重复性好。

[0089] 实施例5 以不同批次的豆粕、棉粕、葵花籽粕、米糠粕、菜粕种蛋白型饲料原料为底物的植酸磷释放率的评估试验,以检测方法的重现性。

[0090] 1) 底物样品为3个批次的豆粕、棉粕、葵花籽粕、米糠粕、菜粕(粉碎过筛60目),消化方法同实施例1,消化结束后得到消化液;

[0091] 2) 消化后处理方法:

[0092] 消化结束后将锥形瓶内的消化液用水冲洗干净无损失地转移到200mL容量瓶中,用超纯水准确定容至刻度,摇匀备用。取容量瓶中的消化液10mL于台式离心机中8000r/min离心10min,取上清液2.5mL加入10mL10%硝酸水溶液,室温震荡30min,取出后于台式离心机中4000r/min离心10min。后取出4mL离心后消化液添加0.4mL10%SDS溶液和1mL (1mol/L) KCL溶液,混匀后4000r/min离心10min,过0.22 μ m水系膜,得待测液。

[0093] 3) 将处理后的待测液按照团体标准的方法进行吸光值的检测,数据处理和计算,试验结果见表11。

表 11 植酸磷释放率汇总表

饲料	1	2	3	变异系数%
豆粕	49.64	48.97	49.44	0.29
棉粕	81.07	79.99	80.49	0.67
菜粕	43.31	42.98	43.16	0.38
葵花籽粕	67.20	67.34	66.95	0.29
米糠粕	41.65	42.01	41.97	0.47

注: 单位为%, 1~3 代表3次不同批次试验。

[0095] 4) 试验结论:蛋白类饲料按照本发明优化的方案进行测定后,变异系数分别为

0.29%、0.67%、0.38%、0.29%、0.47%，方法重现性好。

[0096] 综上，本发明提出的饲料原料中植酸磷释放率的体外检测方法，经过抗干扰处理能有效解决蛋白质对样品中无机磷含量测定的干扰影响，获得重复性和准确度比现行团体标准更好的结果。

[0097] 对于本领域技术人员而言，显然本发明不限于上述示范性实施例的细节，而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下，能够以其他的具体形式实现本发明。因此，无论从哪一点来看，均应将实施例看作是示范性的，而且是非限制性的，本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定，因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0098] 此外，应当理解，虽然本说明书按照实施方式加以描述，但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案，说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见，本领域技术人员应当将说明书作为一个整体，各实施例中的技术方案也可以经适当组合，形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

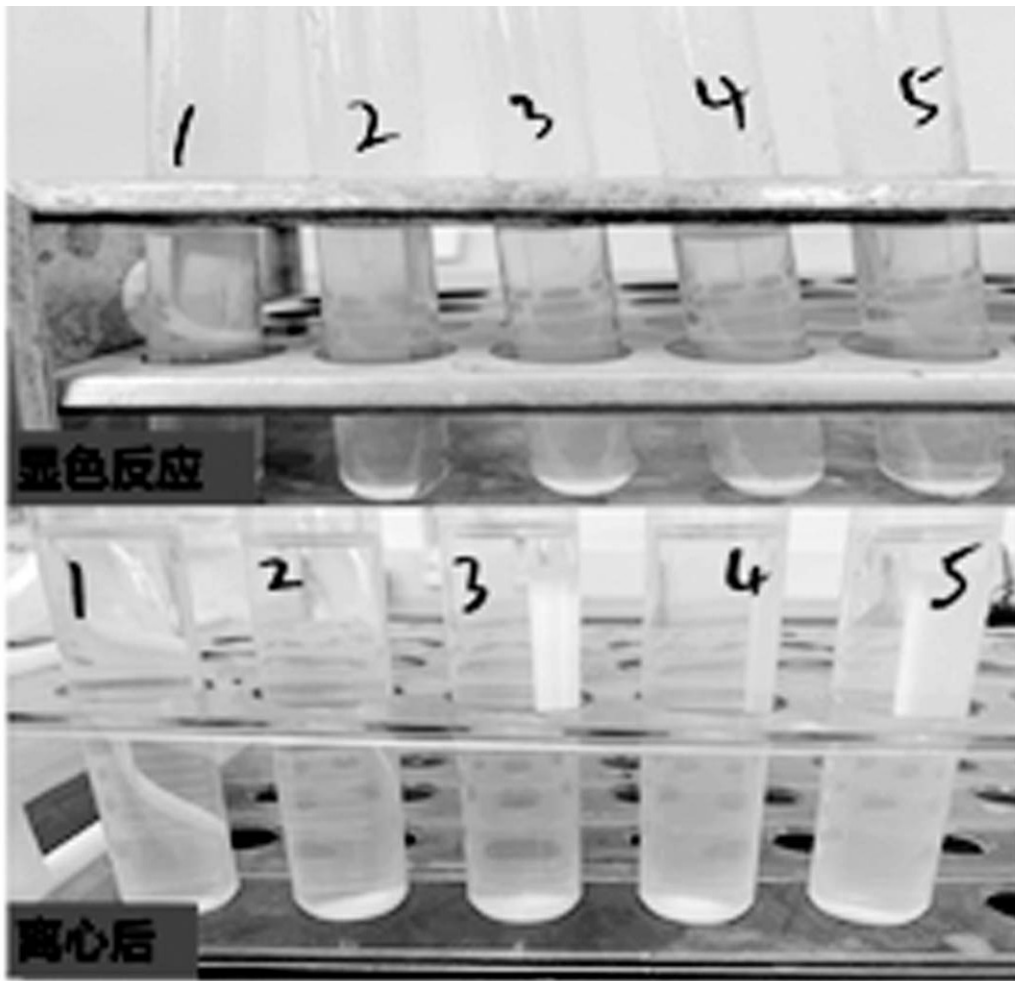


图 1

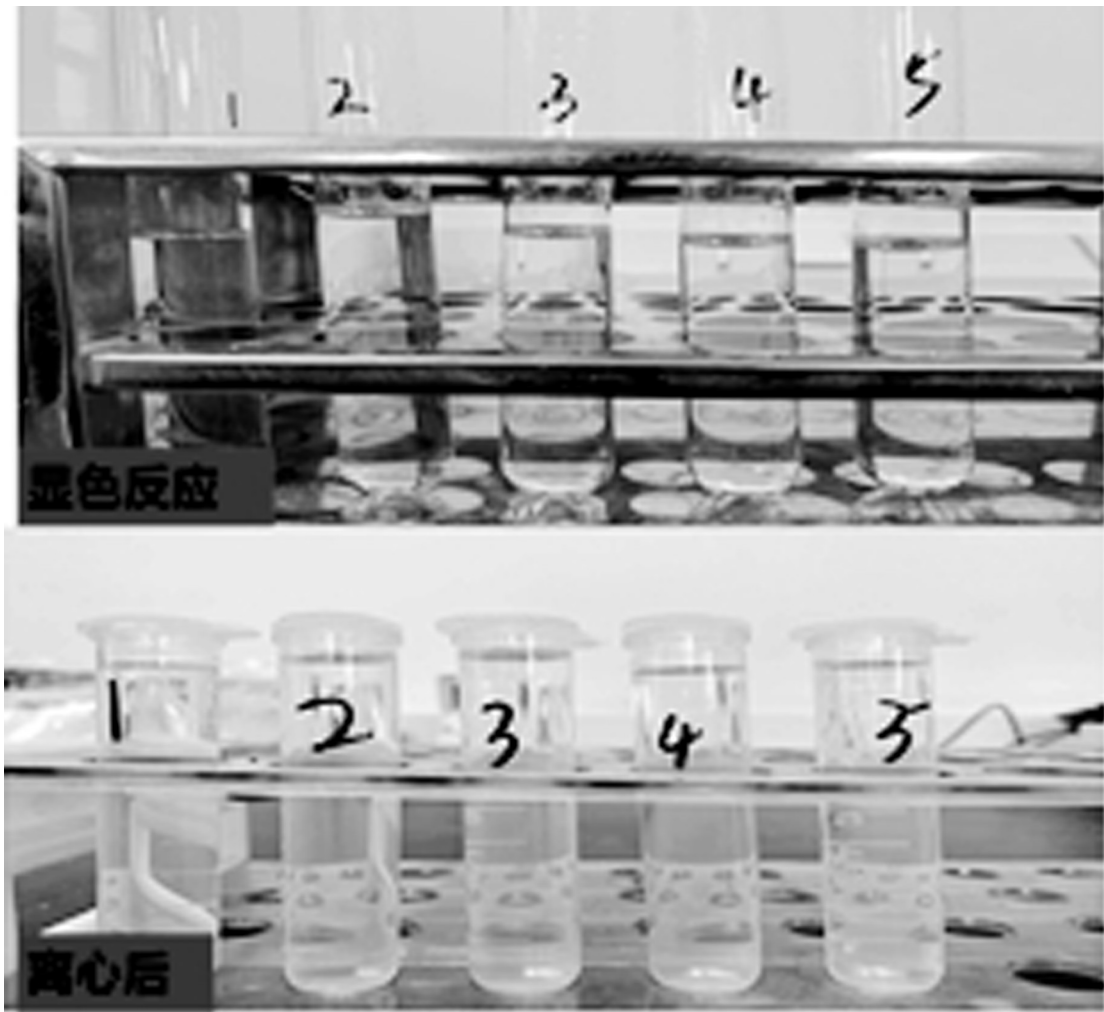


图 2