



中华人民共和国国家标准

GB XXXX—XXXX

食品安全国家标准

食品营养强化剂 酵母 β -葡聚糖

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

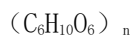
食品营养强化剂 酵母 β -葡聚糖

1 范围

本标准适用于以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为原料, 经过细胞破壁提取、酸、碱处理、分离纯化、干燥等工序加工后, 得到的高浓度 β -1,3/ β -1,6-葡聚糖为主要成分的食品营养强化剂酵母 β -葡聚糖。

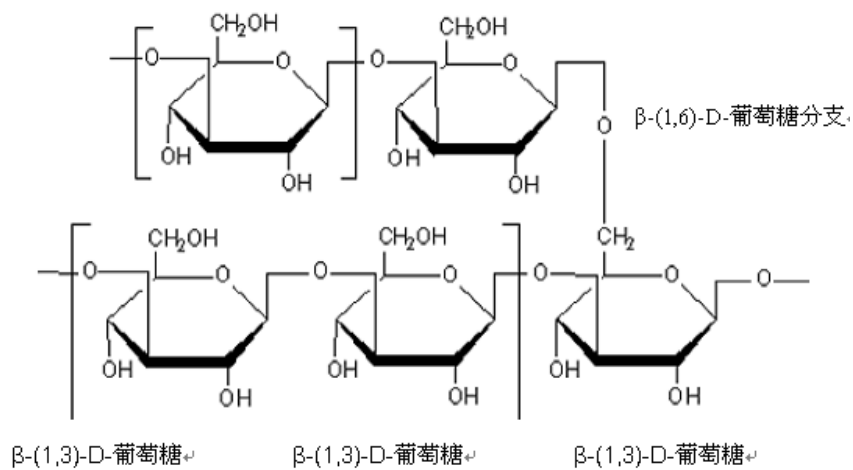
2 分子式、结构式和相对分子质量

2.1 分子式



n: 聚合度, $125 \leq n \leq 25000$ 。

2.2 结构式



2.3 相对分子质量

20 kDa~4000 kDa (按 2018 年国际相对原子质量)。

3 技术要求

3.1 感官要求

感官要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	要 求	检验方法
色泽	浅黄色至黄褐色	取适量试样置于清洁、干燥的白瓷盘中，在自然光线下观察其色泽和状态，并嗅其气味
状态	粉末	
气味	具本品特有的气味	

3.2 理化指标

理化指标应符合表2的规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标	检验方法
酵母 β -葡聚糖含量, w/%	\geq 75	附录 A 中 A.3
蛋白质, w/%	\leq 3.5	GB 5009.5 第一法
脂肪, w/%	\leq 10.0	GB 5009.6 第二法
水分, w/%	\leq 8.0	GB 5009.3 第一法
总灰分, w/%	\leq 3.0	GB 5009.4 第一法
铅 (Pb) / (mg/kg)	\leq 0.5	GB 5009.12 或 GB 5009.75
砷 (以 As 计) / (mg/kg)	\leq 0.5	GB 5009.11 或 GB 5009.76
汞 (以 Hg 计) / (mg/kg)	\leq 0.05	GB 5009.17
镉 (Cd) / (mg/kg)	\leq 0.5	GB 5009.15

3.3 微生物限量

微生物限量应符合表3的规定。

表 3 微生物限量

项 目	采样方案 ^a 及限量 (若非指定, 均以 CFU/g 表示)				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数	5	2	10000	50000	GB 4789.2
大肠菌群	5	2	10	100	GB 4789.3 平板计数法
金黄色葡萄球菌	5	0	0/25g	-	GB 4789.10
沙门氏菌	5	0	0/25g	-	GB 4789.4

^a样品的分析及处理按 GB 4789.1 执行。

附录 A

检验方法

A.1 一般规定

本标准所用试剂和水在未注明其他要求时，均指分析纯试剂和GB/T 6682规定的三级水。试验中所用标准溶液、杂质测定用标准溶液、制剂和制品在未注明其他要求时，均按GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

A.2 鉴别试验

酵母 β -葡聚糖鉴别按照QB/T 4572规定的方法进行。酵母 β -葡聚糖的红外光谱图应符合酵母 β -葡聚糖标准品红外光谱图特征（附录B），在 3419 cm^{-1} 附近有较宽、较强的吸收峰（糖类的O-H伸缩振动吸收），在 2923 cm^{-1} （糖类的C-H伸缩振动吸收）和 889 cm^{-1} （糖类 β -构型特征吸收）附近有较弱的吸收峰。

A.3 酵母 β -葡聚糖含量的测定

A.3.1 酸水解法（第一法）

A.3.1.1 酸水解法原理

酵母 β -葡聚糖样品经酸水解后，样品中的葡萄糖和其他成分经高效液相色谱柱分离，通过示差折光检测器检测，采用外标法定量测定。

注：在酵母 β -葡聚糖水解过程中，可能存在其水解不彻底，以及水解产物葡萄糖因高温部分发生其他副反应的现象，导致检测结果中酵母 β -葡聚糖含量偏低。

A.3.1.2 仪器和设备

A.3.1.2.1 电子天平：感量为0.1mg。

A.3.1.2.2 恒温干燥箱： $100^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

A.3.1.2.3 恒温水浴锅： $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

A.3.1.2.4 高压灭菌锅。

A.3.1.2.5 涡旋混合器。

A.3.1.2.6 高效液相色谱仪：带示差检测器和糖柱（ $6.5\text{ mm}\times 300\text{ mm}$ ），或具有同等分析效果的分离柱。

A.3.1.3 试剂和溶液

A.3.1.3.1 水：GB/T6682，一级水。

A.3.1.3.2 盐酸：37%。

A.3.1.3.3 无水葡萄糖（CAS号：50-99-7）纯度：AR， $\geq 99.5\%$ 。

A.3.1.3.4 葡萄糖标准溶液（2.0 g/L）：称取0.2 g（精确至0.001 g）经过 $98^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 干燥2 h的葡萄糖（A.3.1.3.3），加水（A.3.1.3.1）溶解并定容至100 mL，摇匀。

A.3.1.3.5 酵母 β -葡聚糖对照品：已知纯度，且纯度 $\geq 75\%$ 。

A.3.1.3.6 氢氧化钠溶液（300 g/L）：称取氢氧化钠300 g（精确至0.01 g），用水（A.3.1.3.1）定容至1000 mL，摇匀。

A.3.1.3.7 醋酸纤维素膜：孔径 0.22 μ m。

A.3.1.4 样品处理

称取 0.4 g（精确至 0.001 g）样品或酵母 β -葡聚糖对照品（A.3.1.3.5）至 20 mL 带螺帽的试管中，加入 6.0 mL 盐酸（A.3.1.3.2），盖紧振荡，得到均一的悬浮液。将试管放入 30 $^{\circ}$ C 水浴中保持 45 min（每 15 min 用涡旋混合器振荡混合一次）。将水浴后的悬浮液转移到 200 mL 螺旋盖耐热瓶中，用 100 mL~120 mL 的水（A.3.1.3.1）分几次洗涤试管，洗涤液并入带螺旋盖耐热瓶中。将带螺旋盖耐热瓶放入高压灭菌锅，经 121 $^{\circ}$ C，60 min 灭菌处理。取出后冷却至室温，用氢氧化钠溶液（A.3.1.3.6）调至 pH 6~7 后转移至 200 mL 容量瓶中，用水（A.3.1.3.1）定容，混匀。使用 0.22 μ m 孔径的醋酸纤维素膜过滤备用。

A.3.1.5 参考色谱条件

柱温：80 $^{\circ}$ C，流动相：纯水，流速：0.5 mL/min，进样量：20 μ L，色谱柱：糖柱（6.5 mm \times 300 mm）或具有同等分析效果的分离柱，检测器：示差检测器。

A.3.1.6 标准曲线的绘制

分别量取葡萄糖标准溶液（A.3.1.3.4）2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL、10.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用水（A.3.1.3.1）定容并摇匀，得到葡萄糖浓度分别为 400 mg/L、800 mg/L、1200 mg/L、1600 mg/L、2000 mg/L 的系列标准溶液。在 A.3.1.2.3 色谱条件下进样 20 μ L，根据色谱峰面积和葡萄糖浓度绘制标准曲线。

A.3.1.7 样品及对照品的测定

在同样的色谱条件下，将经 A.3.1.4 方法处理后的样品和酵母 β -葡聚糖对照品溶液分别注入色谱仪中，记录各色谱峰的保留时间和峰面积。用葡萄糖标准溶液的色谱峰保留时间定性，用葡萄糖标准溶液色谱峰的峰面积定量。

A.3.1.8 结果计算

酵母 β -葡聚糖的含量按公式（1）计算：

$$X_1 = \frac{c_1 \times 0.2 \times 100}{m_1 \times 1000} \times 0.9 \times F_1 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X_1 ——样品中酵母 β -葡聚糖的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

c_1 ——根据样品溶液的峰面积，通过标准曲线计算得到的样品溶液的葡萄糖的含量，单位为毫克每升（mg/L）；

0.2 ——样品或标准品酵母 β -葡聚糖处理后定容的体积，单位为升（L）；

100 ——百分含量转换系数；

m_1 ——称取样品的质量，单位为克（g）；

1000 ——毫克与克的转换系数；

0.9 ——将葡萄糖换算成酵母 β -葡聚糖的系数；

F_1 ——样品酸水解中葡萄糖被破坏造成结果偏低的经验补偿系数。

F_1 值按公式 (2) 计算:

$$F_1 = \frac{P_1 \times (100 - W) \times m_2 \times 1000}{c_2 \times 0.2 \times 100 \times 0.9} \dots \dots \dots (2)$$

式中:

P_1 ——酵母 β -葡聚糖对照品的纯度(依据试剂厂家提供的检测报告),单位为克每百克(g/100 g);

W ——酵母 β -葡聚糖对照品的水分(依据试剂厂家提供的检测报告),单位为克每百克(g/100 g);

m_2 ——称取酵母 β -葡聚糖对照品的质量,单位为克(g);

1000——毫克与克的转换系数;

c_2 ——根据酵母 β -葡聚糖对照品溶液的峰面积,通过标准曲线计算得到的对照品溶液的葡萄糖的含量,单位为毫克每升(mg/L);

0.2——样品或酵母 β -葡聚糖对照品处理后定容的体积,单位为升(L);

100——百分含量转换系数;

0.9——葡萄糖与酵母 β -葡聚糖的换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,保留至整数。

A.3.1.9 精密度

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5%。

A.3.2 酶水解法

A.3.2.1 酶水解法原理

酵母 β -葡聚糖经氢氧化钾溶液凝胶化后,通过溶壁酶、 β -(1,6)-葡聚糖酶、 β -(1,3)-葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶多次酶解,最终水解为葡萄糖。葡萄糖氧化酶(GOD)在有氧条件下催化葡萄糖氧化,生成D-葡萄糖酸- δ -内脂和过氧化氢。过氧化氢经过氧化物酶(POD)催化,与4-氨基安替比林和对羟基苯甲酸生成红色醌亚胺(GODPOD法)。利用分光光度计在510 nm波长处测定醌亚胺吸光度,计算试样中葡萄糖含量,进而计算得到酵母 β -葡聚糖的含量。

A.3.2.2 仪器和设备

A.3.2.2.1 涡旋混合器。

A.3.2.2.2 恒温水浴锅。

A.3.2.2.3 分光光度计。

A.3.2.3 试剂和溶液

A.3.2.3.1 酵母 β -葡聚糖对照品:已知纯度,且纯度 $\geq 75\%$ 。

A.3.2.3.2 溶壁酶:酶活力 ≥ 200 u/mg。

A.3.2.3.3 β -(1,6)-葡聚糖酶:酶活力 ≥ 2 u/mg。

A.3.2.3.4 β -(1,3)-葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶混合酶:酶活力分别 ≥ 100 u/mL 和20 u/mL。

A.3.2.3.5 葡萄糖系列标准溶液:分别量取0.6 mL、1.0 mL、2.5 mL、4.0 mL 和5.0 mL 葡萄糖标准溶液(A.3.1.3.4)至10 mL 容量瓶中,加水定容并混匀。其葡萄糖浓度分别为0.12 g/L、0.20 g/L、0.50 g/L、0.80 g/L、1.00 g/L。

A.3.2.3.6 氢氧化钾溶液(2 mol/L):称取11.2 g 氢氧化钾(精确至0.01 g),加水充分溶解,定容至100 mL,混匀后4°C冷藏保存。

A.3.2.3.7 氢氧化钠溶液 (1 mol/L)：称取4 g 氢氧化钠 (精确至 0.01 g)，加水充分溶解后，定容至 100 mL，混匀。

A.3.2.3.8 乙酸钠缓冲溶液A (pH 5)：分别称取5.25 g 无水乙酸钠 (精确至 0.01 g) 和2.16 g 冰醋酸 (精确至 0.01 g) 至400 mL水中，用氢氧化钠溶液 (A.3.2.3.7) 或冰醋酸调节pH 至5，加水定容至500 mL，混匀。

A.3.2.3.9 乙酸钠缓冲溶液B (pH 3.8)：分别称取4.96 g 无水乙酸钠 (精确至 0.01 g) 和32.32 g 冰醋酸 (精确至 0.01 g) 于400 mL纯净水中，用氢氧化钠溶液 (A.3.2.3.7) 或冰醋酸调节pH 至3.8，加水定容至500 mL，混匀。

A.3.2.3.10 缓冲溶液C (pH 7.5)：溶解1.212 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) (精确至 0.001 g)、1.169 g 氯化钠 (精确至 0.001 g) 以及0.416 g EDTA-四钠二水合物 (精确至 0.001 g) 于90 mL 水中。用盐酸或氢氧化钠溶液 (A.3.2.3.7) 调节pH 至7.5，加水定容至100 mL，混匀。

A.3.2.3.11 溶壁酶溶液 (10 u/μL)：移取适量溶壁酶至含有10% 缓冲溶液C (A.3.2.3.10) 中，使溶壁酶最终浓度为10 u/μL (-15°C条件下可保存1 年，不应反复冻融)。

A.3.2.3.12 β-(1,6)-葡聚糖酶溶液：溶解适量β-(1,6)-葡聚糖酶 (A.3.2.3.3) 于乙酸钠缓冲溶液A (A.3.2.3.8) 中，终浓度为1 u/300μL (悬浊液，-15°C条件下可保存60 天，不应反复冻融)。

A.3.2.3.13 混合酶溶液：移取适量β-(1,3)-葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶混合酶 (A.3.2.3.4)，加入适量乙酸钠缓冲溶液A (A.3.2.3.8) 稀释混匀，使最终浓度分别为20 u/mL 和4 u/mL (使用期间冰浴保存，当天使用；未使用的可以-15°C冰冻保存2 年，不应反复冻融)。

A.3.2.3.14 GODPOD 缓冲液：在200 mL容量瓶中加入约160 mL水，随后分别加入27.2 g 磷酸二氢钾 (精确至 0.01 g)、8.4 g 氢氧化钠 (精确至 0.01 g) 和6.0 g 对羟基苯甲酸 (精确至 0.01 g)，搅拌使其完全溶解后，调节pH 至7.4，最后加入0.8 g 叠氮化钠，溶解后加水定容至刻度。4°C保存，有效期4 年。稀释：量取GODPOD 缓冲液48 mL 至1000 mL 容量瓶中，加水定容并混匀，现用现配。

A.3.2.3.15 GODPOD 混合酶粉末：葡萄糖氧化酶 (≥400 u)、过氧化物酶 (≥1000 u) 和4-氨基安替比林。

A.3.2.3.16 GODPOD 工作液：量取20 mL 稀释后的GODPOD缓冲液 (A.3.2.3.14) 至GODPOD混合酶粉末 (A.3.2.3.15) 中并轻轻晃动至充分溶解。再加入剩余稀释后的980 mL GODPOD缓冲溶液 (A.3.2.3.14)，避光4°C保存，有效期3 个月 (-20°C保存，有效期12 个月，不应反复冻融)。

注：A.3.2.3.10- A.3.2.3.16 溶液也可使用商品化试剂或试剂盒。

A.3.2.4 样品处理

称取样品或对照品 (A.3.2.3.1) 15 mg~20 mg (精确至0.001 g) 至离心管中，加入0.4 mL冷的氢氧化钾溶液 (A.3.2.3.6)，冰水浴涡旋20 min，冰水浴期间多次短时涡旋至全部沉淀分散且无可见结块。加入1.6 mL乙酸钠缓冲溶液B (A.3.2.3.9) 及600 μL溶壁酶溶液 (A.3.2.3.11)，记录此时溶液总体积为V1，将反应液50 °C 孵育12 h~18 h后，冷却至室温。吸取130 μL (V2) 冷却的该酶解液至2 mL离心管中，加入25 μL氢氧化钾溶液 (A.3.2.3.6) 和300 μL β-(1,6)-葡聚糖酶溶液 (A.3.2.3.12)，80 °C 孵育15 min 后，冷却至室温。再加入390 μL混合酶溶液 (A.3.2.3.13)，记录此时溶液总体积为V3，40 °C 孵育1 h 后，冷却至室温。移取适量溶液过膜后进行检测。

A.3.2.5 酶水解空白溶液

移取20 μL 冷的氢氧化钾溶液 (A.3.2.3.6) 至5 mL 离心管中，加入80 μL乙酸钠缓冲液B (A.3.2.3.9)，

混匀后再加入30 μL 溶壁酶溶液（A.3.2.3.11），混匀。50 ℃ 孵育12 h~18 h 后，冷却至室温。再加入25 μL 氢氧化钾溶液（A.3.2.3.6）和300 μL β-(1,6)-葡聚糖酶溶液（A.3.2.3.12），80 ℃ 孵育15 min 后冷却至室温。最后加入390 μL 混合酶溶液（A.3.2.3.13），40 ℃ 孵育1 h后冷却至室温。移取适量溶液过膜后进行检测。

A.3.2.6 标准曲线的绘制

依次移取100 μL 葡萄糖系列标准溶液（A.3.2.3.5）至5 mL离心管中，再加入3 mL GODPOD工作液（A.3.2.3.16），40 ℃ 水浴20 min。移出水浴并冷却至室温，过膜后全部转移至1 cm 比色皿中，以GODPOD工作液（A.3.2.3.16）为空白，以分光光度计测量510 nm 处吸光度。以吸光度为纵坐标，以系列标准溶液的浓度为横坐标，绘制标准曲线。

A.3.2.7 样品溶液的测定

分别量取100 μL 经A.3.2.4 步骤处理后的样品溶液、对照品溶液以及经A.3.2.5 步骤处理后的酶水解空白溶液于5 mL 离心管中，再分别加入3 mL GODPOD 工作液（A.3.2.3.16），40 ℃ 水浴20 min。移出水浴并冷却至室温后，过膜，全部转移至1 cm 比色皿中，以GODPOD 工作液（A.3.2.3.16）为空白，以分光光度计测量510 nm 处吸光度，利用标准曲线计算试样溶液中葡萄糖的浓度。可根据具体试样进行稀释(f)。

A.3.2.8 结果计算

酵母β-葡聚糖样品的含量按公式（3）计算：

$$X_2 = \frac{100 \times (c_3 - c_0) \times 0.9 \times F_2}{m_3 / V_1 \times V_2 / V_3 / f} \dots \dots \dots (3)$$

式中：

- X₂——样品中葡聚糖的纯度，单位为克每百克（g/100 g）；
- 100——百分含量转换系数；
- c₃——样品酶解液最终的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）；
- c₀——酶水解空白溶液的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）；
- 0.9——葡萄糖和酵母β-葡聚糖换算系数；
- F₂——对照品补偿系数；
- m₃——样品质量，单位为毫克（mg）；
- V₁——溶壁酶酶解后酶解液的体积，单位为毫升（mL）；
- V₂——从溶壁酶酶解液中移取的酶解液体积，单位为毫升（mL）；
- V₃——完成所有酶解后的终体积，单位为毫升（mL）；
- f——测定葡萄糖含量过程中的稀释倍数。

酵母β-葡聚糖对照品的含量按公式（4）计算：

$$P' = \frac{100 \times (c_5 - c_0) \times 0.9}{m_5 / V_1 \times V_2 / V_3 / f} \dots \dots \dots (4)$$

式中：

- P' ——根据对照品酶解液最终的葡萄糖含量（c₅）计算的对照品纯度，单位为克每百克（g/100g）；
- 100——百分含量转换系数；

- c_s ——对照品酶解液最终的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）
- c_0 ——酶水解空白溶液的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）；
- 0.9——葡萄糖和酵母β-葡聚糖换算系数；
- m_s ——对照品质量，单位为毫克（mg）；
- V_1 ——溶壁酶酶解后酶解液的体积，单位为毫升（mL）；
- V_2 ——从溶壁酶酶解液中移取的酶解液体积，单位为毫升（mL）；
- V_3 ——完成所有酶解后的终体积，单位为毫升（mL）；
- f ——测定葡萄糖含量过程中的稀释倍数。

公式（3）中：

$$F_2 = \frac{P_2}{P'} = \frac{P_2 \times m_s / V_1 \times V_2 / V_3 / f}{100 \times (c_s - c_0) \times 0.9} \dots\dots\dots(5)$$

式中：

- F_2 ——对照品补偿系数；
- P_2 ——对照品纯度（依据试剂厂家提供的纯度报告），单位为克每百克（g/100g）；
- P' ——根据对照品酶解液最终的葡萄糖含量（cS）计算的对照品纯度，单位为克每百克（g/100g）；
- m_s ——对照品质量，单位为毫克（mg）；
- V_1 ——溶壁酶酶解后酶解液的体积，单位为毫升（mL）；
- V_2 ——从溶壁酶酶解液中移取的酶解液体积，单位为毫升（mL）；
- V_3 ——完成所有酶解后的终体积，单位为毫升（mL）；
- f ——测定葡萄糖含量过程中的稀释倍数；
- 100——百分含量转换系数；
- c_s ——对照品酶解液最终的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）；
- c_0 ——酶空白溶液的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）；
- 0.9——葡萄糖和酵母β-葡聚糖换算系数。

当样品与对照品按照A.3.2.4 操作过程中，二者的 V_1 、 V_2 、 V_3 和 f 完全相同时，公式（3）可简化为：

$$X_2 = \frac{(c_3 - c_0) \times m_s \times P_2}{(c_s - c_0) \times m_3} \dots\dots\dots(6)$$

式中：

- X_2 ——样品中葡聚糖的纯度，单位为克每百克（g/100 g）；
 - c_3 ——样品酶解液最终的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）；
 - c_0 ——酶空白溶液的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）；
 - m_s ——对照品质量，单位为毫克（mg）；
 - P_2 ——对照品纯度（依据试剂厂家提供的纯度报告），单位为克每百克（g/100g）；
 - c_s ——对照品酶解液最终的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）
 - m_3 ——样品质量，单位为毫克（mg）；
- 计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留至整数。

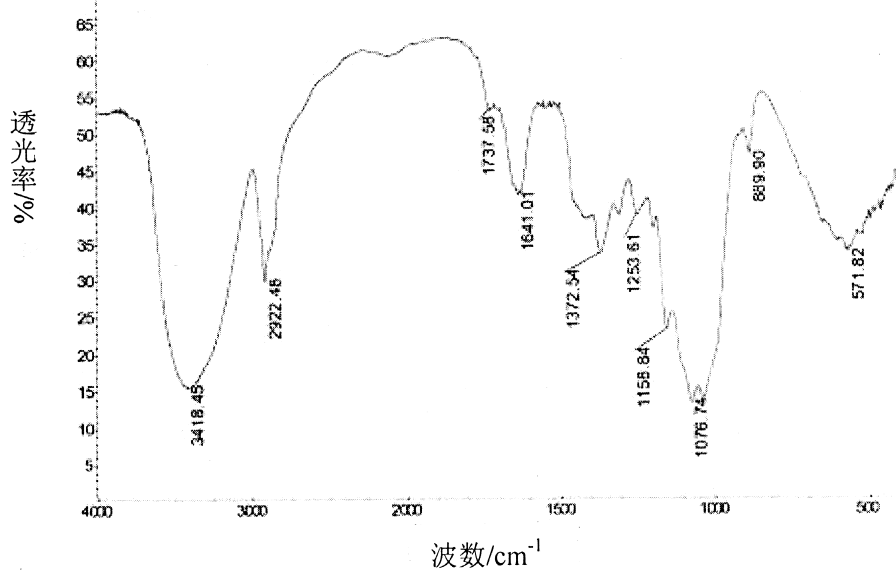
A. 3. 2. 9 精密度

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 5%。

附录 B

酵母 β -葡聚糖标准品红外光谱图

酵母 β -葡聚糖的红外光谱图应符合酵母 β -葡聚糖标准品红外光谱图特征，在 3419 cm^{-1} 附近有较宽、较强的吸收峰，在 2923 cm^{-1} 和 889 cm^{-1} 附近有较弱的吸收峰。



酵母 β -葡聚糖标准品红外光谱图