ICS 67.180
X 69

QB

中 华 人 民 共 和 国 轻 工 行 业 标 准

QB/T 4572—XXXX

酵母 β-葡聚糖

Yeast β- glucan

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部　　发 布

前　　言

本标准按照GB/T 1.1-2009的规则起草。

本标准代替了QB/T4572-2013《酵母β-葡聚糖》。

本标准与QB/T4572-2013相比，主要技术变化如下：

——增加了酵母β-葡聚糖原料的酶解测定方法（6.4）。

——增加了食品中酵母β-葡聚糖的测定方法（附录A）。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会工业发酵分技术委员会（SAC/TC64/SC5）归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——QB/T4572-2013。

酵母β-葡聚糖

1 范围

本标准规定了酵母β-葡聚糖的术语和定义、分子式、相对分子量及结构式、要求、试验方法、检验规则、标志、包装、运输及贮存等要求。

本标准适用于以酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae.*）为原料，经过细胞破壁、酶解、酸、碱处理、分离提纯、干燥等工艺制得的酵母β-葡聚糖产品的生产、检验和销售。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 191 包装储运图示标志
GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备
GB/T 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备
GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备
GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定
GB 5009.4-2016 食品安全国家标准 食品中灰分的测定
GB 5009.5-2010 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定
GB 5009.6-2016 食品安全标准食品中脂肪的测定
GB 15203-2014 食品安全国家标准 淀粉糖
GB/T 6040 红外光谱分析方法通则
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

酵母β-葡聚糖 Yeast β- Glucan

以β-（1，3）-D-葡聚糖为主链含有β-（1，6）分支的可食用的一种多糖。

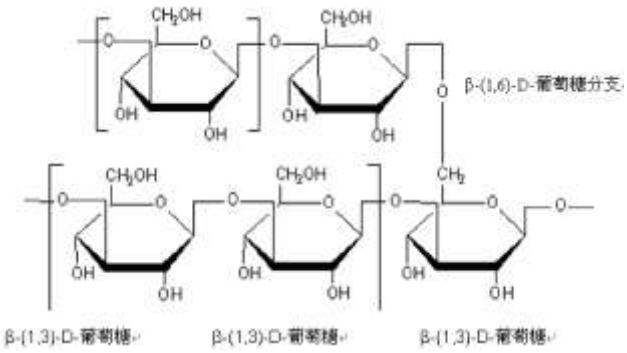
注：可作为食品或食品配料，食品中酵母β-葡聚糖的测定参见附录A。

4 分子式、相对分子量及结构式

4.1 分子式：（$C_6H_{10}O_6$）$_n$，n 介于 125-25000 之间。

4.2 相对分子质量：20Kda-4000Kda（按 2018 年国际原子量表）

4.3 结构式



5 要求

5.1 感官要求

应符合表1规定。

表1 感官要求

项　　目	要　　求
状　　态	细度均匀的粉末。
色　　泽	淡黄色至黄褐色。
气　　味	具有本品特有的气味。
杂　　质	无正常视力可见杂质

5.2 理化要求

应符合表2的规定。

表2 理化要求

项　目		指　标
鉴别		符合6.3要求
酵母β-葡聚糖含量[a]/ g/100 g	≥	70
蛋白质/ g/100 g	≤	3.5
脂肪/ g/100 g	≤	10.0
水分/ g/100 g	≤	8.0
总灰分/ g/100 g	≤	3.0
[a]食品中酵母β葡聚糖的测定参见附录A		

5.3 污染物限量要求

应符合GB15203的限量要求。

5.4 微生物要求

应符合表3的规定。

表3 微生物要求

项　　目	指　　标
菌落总数/（CFU/ g）	n=5,c=2,m=10000,M=50000
大肠菌群/（CFU/ g）	n=5,c=2,m=3,M=10
沙门氏菌/25 g	不得检出
金黄色葡萄球菌/25 g	不得检出

6　试验方法

6.1　一般要求

本方法中所用的水，在未注明其他要求时，均指分析纯试剂和GB/T 6682-2008中规定的三级水。所用试剂，在未注明其他规格时，均指分析纯（AR）。分析中所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其它要求时，均按GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603的规定制备。

6.2　感官

取适量样品，倒在白色瓷盘上，在自然光线下，观察样品的色泽、性状，有无杂质，并嗅其气味。

6.3　鉴别

6.3.1　脱脂

称取 5 g 样品，加入正己烷和甲醇的混合液（*V*：*V*=4：1）100 mL，90℃水浴回流加热 2 h，冷却至 40℃，除去上层清液；剩余残渣依次用正己烷、甲醇、丙酮和乙醚各 100 mL 洗涤，干燥，得到脱脂后样品。

6.3.2　测定

采用溴化钾涂片法，取脱脂后样品，混合溴化钾，使用压片装置，在常压或真空条件下加压成型制成透明状片剂，按照GB/T 6040测定红外吸收光谱。

6.3.3　判定

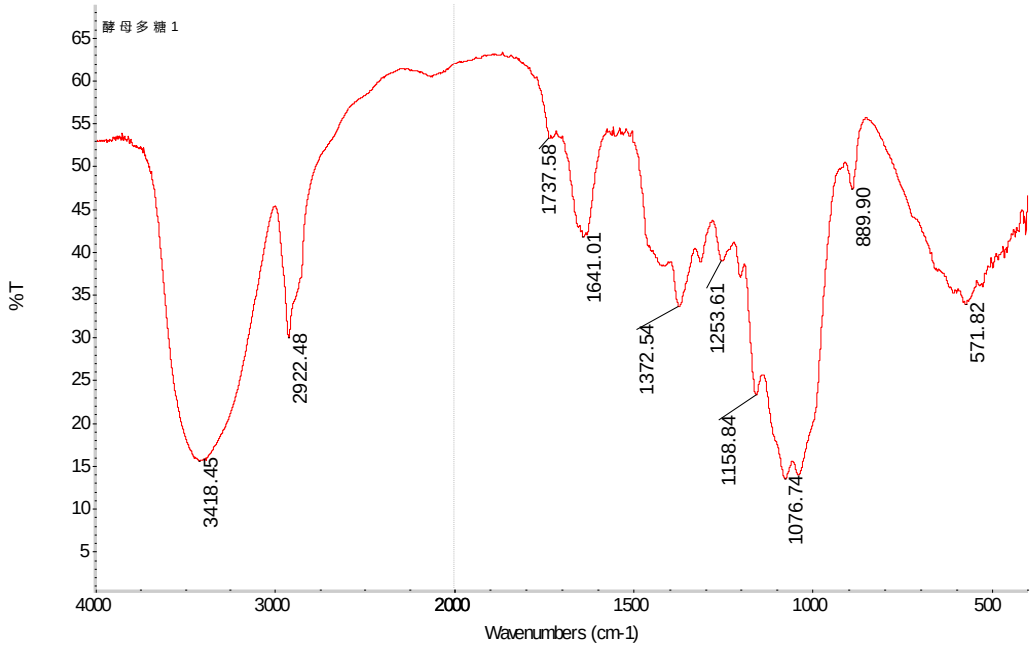
按下述要求进行判定：

——试样红外光谱图与标准红外光谱图（图 1）应一致；

——3419 cm^{-1} 附近有较宽、较强的吸收峰（糖类的 O－H 键的伸缩振动吸收峰）；

——2923 cm^{-1} 附近有较弱吸收峰（糖类 C－H 键伸缩振动吸收峰）；

——889 cm^{-1} 附近有较弱吸收峰（糖类 β-构型特征吸收峰）。



注：图中横坐标为波长数值，单位为 cm^{-1}；纵坐标为透光率，单位为%

图1 脱脂酵母β-葡聚糖标准品的红外光谱图

6.4 酵母 β-葡聚糖含量的测定

6.4.1 酸水解法

6.4.1.1 原理

根据葡萄糖在流动相和固定相之间具有不同的分配系数，将水解后的样品注入液相色谱，用纯水做流动相，糖类分子流出后，经示差检测器检测，用外标法定量测定。

注：在酵母β-葡聚糖水解时，由于样品可能存在水解不彻底，以及水解产生的葡萄糖由于高温造成部分发生其它副反应，导致检测结果比产品中实际含有的酵母 β-葡聚糖偏低。检测中采用酵母 β-葡聚糖对照品对上述水解过程引起的误差进行修正。

6.4.1.2 仪器和设备

6.4.1.2.1 涡旋混合器。

6.4.1.2.2 高效液相色谱仪：带示差检测器和糖柱（6.5 mm×300 mm，waters su gar pak-1 或同等分析效果的分离柱）。

6.4.1.3 试剂和溶液

6.4.1.3.1 水：GB/T6682，一级水。

6.4.1.3.2 盐酸：37%。

6.4.1.3.3 无水葡萄糖。

6.4.1.3.4 葡萄糖标准溶液（2 g/L）：称取 0.2 g（精确至 0.0001 g）经过 98℃～100℃干燥 2 h 的葡萄糖，加水（6.4.1.3.1）溶解并定容至 100 mL。

6.4.1.3.5 酵母 β-葡聚糖对照品；Sigma C7821 或同等分析效果的标准品。

6.4.1.3.6 氢氧化钠溶液（300 g/L）：称取氢氧化钠 300.0 g，用水（6.4.1.3.1）定容至 1000 mL。

6.4.1.4 样品处理

准确称取 0.4 g（精确至 0.1 mg）样品至 20 mL 带螺帽的试管中，加入 6.0 mL 盐酸（6.4.1.3.2），盖紧振荡，得到均一的悬浮液。将试管放入 30℃水浴中 45 min（每 15 min 用涡旋混合器振荡混合一次）。然后将悬浮物定量的转移到 200 mL 杜氏瓶中，用 100 mL～120 mL 的水，分几次洗涤试管，洗涤液并入杜氏瓶中。将杜氏瓶放入高压灭菌锅，121℃，60 min。取出后冷却，用氢氧化钠溶液（6.4.1.3.6）将溶液调 pH 到 6～7，然后定容至 200 mL。使用 0.45μm 孔径的醋酸纤维素膜过滤备用。

同时准确称取酵母 β-葡聚糖对照品（见 6.4.1.3.5）0.4 g（精确至 0.1 mg），按样品处理方法进行同样的处理。

6.4.1.5 色谱条件

采用纯水作为流动相，流速为 0.5 mL/ min，柱温 80℃，待仪器基线平稳后再进样。

6.4.1.6 标准曲线的绘制

分别吸取葡萄糖标准液（见 6.4.1.3.4）2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL、10.0 mL 到 10 mL 容量瓶中，用水(6.4.1.3.1)定容到刻度，得到葡萄糖各为 400 mg/L、800 mg/L、1200 mg/L、1600 mg/L、2000 mg/L 的标样。在 6.3.5 色谱条件下准确进样 20 μL，得到色谱峰面积和标准物质量浓度之间的回归方程，绘制标准曲线。

6.4.1.7 样品及对照品的测定

在同样的色谱条件下，将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来定量。

6.4.1.8 结果计算

酵母 β-葡聚糖的含量按下式计算：

$$X = \frac{A_1 \times 0.2 \times 100}{m_1 \times 1000} \times 0.9 \times F \quad \text{……(1)}$$

式中：

X ——样品中酵母 β-葡聚糖的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

A_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）；

m_1——称取样品的质量，单位为克（g）；

F——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；

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）；

0.9——将葡萄糖换算成酵母 β-葡聚糖的系数；

F 值按式（2）计算：

$$F = \frac{P \times (100 - W)}{\dfrac{A_2 \times 0.2 \times 100}{m_2 \times 1000} \times 0.9} \quad \text{……(2)}$$

式中：

P——酵母 β-葡聚糖标准品的纯度（依据试剂厂家提供的检测报告）；

W——酵母 β-葡聚糖标准品的水分（依据试剂厂家提供的检测报告）；

A_2 ——根据酵母 β-葡聚糖标准品溶液的峰面积，通过标准曲线计算得到的葡聚糖标准品溶液的葡萄糖的含量，单位为毫克每升（mg/L）；

m_2——称取酵母 β-葡聚糖对照品的质量，单位为克（g）。

注：在同一个实验室内，一般 2 个月检测 F 值即可。F 值在 1.14 左右，实验室定期对 F 值进行修正。

6.4.1.9 允许误差

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。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%。

6.4.2 酶解法

6.4.2.1 原理

酵母β-葡聚糖经氢氧化钾溶液凝胶化后，通过溶壁酶、1,6-葡聚糖酶、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。

6.4.2.2 仪器和设备

6.4.2.2.1 涡旋混合器。

6.4.2.2.2 分光光度计。

6.4.2.3 试剂和溶液

6.4.2.3.1 无水葡萄糖，纯度≥99%。

6.4.2.3.2 溶壁酶，酶活力≥200 U/mg。

6.4.2.3.3 (1,6)-葡聚糖酶，酶活力≥2 U/mg。

6.4.2.3.4 (1,3)-葡聚糖酶和葡萄糖苷酶混合酶，酶活力分别≥100 U/mL 和 20 U/mL。

6.4.2.3.5 葡萄糖标准储备液（2.0 g/L）：精称 0.2 g（精确至 0.1 mg）98-100℃干燥 2 h 后的葡萄糖标准品（6.4.2.3.1），水溶解并定容至 100 mL。

6.4.2.3.6 葡萄糖系列标准溶液：分别准确量取 5 mL、4 mL、2.5 mL、1 mL 和 0.6 mL 葡萄糖标准储备液（6.4.2.3.5）至 10 mL 容量瓶中，加水定容并混匀。其葡萄糖浓度分别为 1.0 g/L、0.8 g/L、0.5 g/L、0.2 g/L、0.12 g/L。

6.4.2.3.7 氢氧化钾溶液（2 mol/L）：称取 11.2 g 氢氧化钾，水充分溶解后，定容至 100 mL，4℃冷藏保存。

6.4.2.3.8 氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取 4.0 g 氢氧化钠，水充分溶解后，定容至 100 mL。

6.4.2.3.9 乙酸钠缓冲溶液 A（pH5.0，0.2 mol/L）：分别称取 5.25 g 无水乙酸钠和 2.16 g 冰醋酸至 400 mL 水中，氢氧化钠溶液（6.4.2.3.8）或冰醋酸调节 pH 至 5，水定容至 500 mL。

6.4.2.3.10 乙酸钠缓冲溶液 B（pH3.8，1.2 mol/L）：分别称取 4.96 g 无水乙酸钠和 32.32 g 冰醋酸至 400 mL 水中，氢氧化钠溶液（6.4.2.3.8）或冰醋酸调节 pH 至 3.8，定容至 500 mL。

6.4.2.3.11　TES 缓冲溶液（10 倍，pH7.5）：溶解 1.212 g TRIS、1.169 g 氯化钠以及 0.416 g EDTA 四钠二水合物于 90 mL 纯净水中。用盐酸或氢氧化钠溶液（6.4.2.3.8）调节 pH 至 7.5，最后水定容至 100 mL。

6.4.2.3.12　溶壁酶溶液（10 U/μL）：移取适量溶壁酶（6.4.2.3.2）至含有 10% 10 倍 TES 溶液（6.4.2.3.11）中，使溶壁酶最终浓度为 10U/μL（未使用情况下可-15℃保持 1 年有效，不可反复冻融）。

6.4.2.3.13　(1,6)-葡聚糖酶溶液：溶解适量 1,6-葡聚糖酶（6.4.2.3.3）于乙酸钠缓冲溶液 A（6.4.2.3.9，pH=5.0）中，终浓度为 1U/300μL（悬浊液，-15℃，60 天，不可反复冻融）。

6.4.2.3.14　混合酶溶液：混合 100U 1,3-葡聚糖酶和 20U 葡萄糖苷酶（6.4.2.3.4），乙酸钠缓冲溶液 A（6.4.2.3.9，pH=5.0）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℃冰冻保存 2 年，不可反复冻融）。

6.4.2.3.15　GODPOD 缓冲液：向 200 mL 容量瓶中加入 160 mL 左右水，随后分别加入 27.2 g 磷酸二氢钾，8.4 g 氢氧化钠和 6.0 g 对羟基苯甲酸，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。4℃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。

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

6.4.2.3.17　GODPOD 工作液：移取 20 mL 稀释后的缓冲液至混合酶粉末中并轻轻晃动至充分溶解。再加入剩余稀释后的 980 mL 缓冲溶液，避光 4℃保存，有限期 3 个月（-20℃保存，有限期 12 个月，不可反复冻融）。

注：6.4.2.3.15-6.4.2.3.17 溶液也可使用商品化试剂盒。

6.4.2.4　样品处理

精确称取样品15mg-20 mg至离心管中，加入2 mol/L冷的氢氧化钾溶液（6.4.2.3.7）0.4 mL，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（6.4.2.3.10，pH3.8）及600 μL溶壁酶溶液（6.4.2.3.12），准确记录此时体积为V_1，将反应液50℃孵育12-18 h后，冷却至室温。吸取130μL（V_2）冷却的该酶解液至2 mL离心管中，加入25μL氢氧化钾溶液（6.4.2.3.7）和300μL 1,6-葡聚糖酶（6.4.2.3.13），80℃孵育15 min后，冷却至室温。再加入390μL混合酶液（6.4.2.3.14），准确记录此时体积为V_3，40℃孵育1 h后，冷却至室温。移取适量溶液过膜后进行检测。

注：冰水浴期间每次涡旋时间不应超过10s。

6.4.2.5　酶空白溶液

移取 2 mol/L 冷的氢氧化钾溶液（6.4.2.3.7）20μL 至 5 mL 离心管中，加入乙酸钠缓冲液 B80 μL（6.4.2.3.10，pH3.8），混匀后再加入溶壁酶溶液（6.4.2.3.12）30μL，混匀。50℃孵育 12-18 小时后，冷却至室温。再加入 25μL 氢氧化钾溶液和 300μL 1，6-葡聚糖酶（6.4.2.3.13），80℃孵育 15 min 后，冷却至室温。最后加入 390μL 混合酶溶液（6.4.2.3.14），40℃孵育 1 h，冷却至室温。移取适量溶液过膜后进行检测。

6.4.2.6　标准曲线的绘制

依次移取 100μL 葡萄糖系列标准溶液（6.4.2.3.6）至 5 mL 离心管中，再加入 3 mL GODPOD 工作

液，40℃水浴 20 min。移出水浴，冷却至室温后，全部转移至 1 cm 比色皿中，以空白溶液为空白，利用分光光度计在 510 nm 处测量吸光度，并记录。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。

6.4.2.7　样品溶液的测定

分别移取 100 μL 样品溶液（6.4.2.4）和酶空白溶液（6.4.2.5）至 5 mL 离心管中，再加入 3 mL GODPOD 工作液（6.4.2.3.17），40℃水浴 20 min。移出水浴，冷却至室温后，全部转移至 1 cm 比色皿中，以 GODPOD 工作液为空白，利用分光光度计在 510nm 处测量吸光度，并记录。从标准曲线中查得试样溶液中葡萄糖的浓度。可根据具体试样进行稀释(f)。

6.4.2.8　结果计算

$$X_1 = \frac{100 \times (c - c_0) \times 0.9}{m_2/V_1 \times \frac{V_2}{V_3}/f}$$

其中：

X_1——样品中葡聚糖的纯度，单位为克每百克（g/100 g）；

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）；

c_1——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）；

m_2——样品质量，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=2.6）；

V_2——从溶壁酶酶解液中移取的酶解液体积，单位为毫升（mL=0.13）；

V_3——完成所有酶解后的终体积，单位为毫升（mL=0.845）；

f——测定葡萄糖含量过程中的稀释倍数。

0.9——葡萄糖和酵母β-葡聚糖换算系数。

6.4.2.9　允许误差

试验结果以平行测定结果的算术平均值为准。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%。

6.5　蛋白质

按GB 5009.5-2010规定的方法测定，蛋白质换算系数为6.25。

6.6　脂肪

按GB5009.6-2016中酸水解法测定。

6.7　水分

按GB 5009.3-2016中直接干燥法测定。

6.8　总灰分

按GB 5009.4-2016规定的方法测定。

7　检验规则

7.1 组批

同原料、同配料、同工艺生产的，同一包装线当天包装出厂（或入库的），质量均一的产品为一批。

7.2 抽样

7.2.1 采用适宜的方法保证取样具有代表性，保证取样部位和取样瓶的清洁。对用于微生物试验的取样，应使用无菌操作。

7.2.2 产品按批抽样。无菌条件下，批量少于 600 件时，从不少于 3 件最小规格包装中，抽取 1kg 样品。批量大于 600 件时，按包装件数的 0.5%比例最小规格包装中，抽取 1kg 样品。

7.2.3 将所取样品混匀后，分为两份，一份检验，一份封存备查。密闭保存于包装袋或磨口瓶中，粘贴标签，并注明生产厂名、产品名称、批号、数量、取样日期。

7.3 出厂检验

7.3.1 产品出厂前，应由生产厂的质检部门负责按本标准规定逐批进行检验。检验合格后方可出厂。

7.3.2 出厂检验项目为感官、酵母 β-葡聚糖含量、水分、菌落总数、大肠菌群。

7.4 型式检验

检验项目为本标准要求中规定的全部项目。一般情况下，型式检验每6个月进行一次。有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

a）原辅材料有较大变化时；
b）更改关键工艺或设备时；
c）新试制的产品或正常生产的产品停产 3 个月后，重新恢复生产时；
d）出厂检验与上次型式检验结果有较大差异时；
e）国家质量监督检验机构按有关规定需要抽检时。

7.5 判定规则

7.5.1 抽取样品经检验，所检项目全部合格，判该批产品为合格。

7.5.2 检验结果如有两项及两项以下指标不合格，应重新自同批产品中抽取两倍量样品进行复检，以复检结果为准，若仍有不合格项，判该批产品为不合格。

7.5.3 检验结果如有三项及以上指标不合格，判该批产品为不合格。

8 标志、包装、运输、贮存

8.1 标志

外包装标示符合 GB/T 191 的规定，标签符合 GB 7718 规定。对有特殊要求的包装及标志，按需方要求进行包装及标志。

8.2 包装

包装容器应整洁、卫生、无破损，应符合国家相关规定。

8.3 运输

运输工具应清洁；禁止与有毒、有害、有腐蚀性和含有异味的物品混装、混运，应避免受潮、受压、暴晒；装卸时轻搬、轻放。

8.4 贮存

产品应贮存在阴凉、干燥、通风的仓库内。不得露天存放，不得与有毒有污染的物品或其他杂物混存。

附录 A

（资料性附录）

食品中酵母β-葡聚糖的测定

A.1 范围

本方法适用于调制乳、风味发酵乳、调制乳粉和婴幼儿配方乳粉中不溶性酵母β-葡聚糖的测定。

A.2 原理

利用蛋白酶和脂肪酶去除食品中的脂肪、蛋白质，然后通过离心将酵母β-葡聚糖进行富集。富集后的酵母β-葡聚糖经氢氧化钾溶液凝胶化后，依次通过溶壁酶、1,6-葡聚糖酶、1,3-葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶酶解，最终水解为葡萄糖。葡萄糖在有氧条件下被葡萄糖氧化酶（GOD）催化氧化，生成D-葡萄糖酸-δ-内脂和过氧化氢。过氧化氢被氧化物酶（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）。利用分光光度计测定己酸葡萄糖的含量，再计算得出食品中酵母β-葡聚糖的含量。

A.3 试剂和材料

A.3.1 不溶性酵母 β-葡聚糖对照品：已知纯度，且纯度≥70%。
A.3.2 碱性蛋白酶：酶活力≥200000 U/ g。
A.3.3 中性蛋白酶：酶活力≥80000 U/ g。
A.3.4 酸性蛋白酶：酶活力≥50000 U/ g
A.3.5 脂肪酶：酶活力≥20000 U/ g。
A.3.6 蛋白酶混合溶液：等体积混合碱性蛋白酶和中性蛋白酶，4℃保存。
A.3.7 溶壁酶溶液（5 U/μL）：移取适量溶壁酶（6.4.2.3.2）至含有 10% 10 倍 TES 溶液中，使溶壁酶 A.3.8 最终浓度为 5 U/μL（未使用情况下可以再-15℃保持 1 年有效，不可反复冻融）。
其他试剂：同 6.4.2.3。

A.4 仪器和设备

A.4.1 实验室常用设备。

A.4.2 恒温水浴锅。

A.4.3 分光光度计。

A.5 分析步骤

A.5.1 对照品的制备

准确称取 3-10 mg 已知纯度酵母 β-葡聚糖对照品（精确至 0.1 mg，与待测样品中酵母 β-葡聚糖含量相近）于 15 mL 尖底离心管中，加入 10 g 空白牛奶、酸奶或奶粉样品，充分混匀。

A.5.2 富集

A.5.2.1 牛奶等中性或碱性液体样品

分别称取 10 g（精确至 0.01 g，或相当于 3-10 mg 酵母 β 葡聚糖的样品质量）混匀后的液体样品和制备的对照品样品（A5.1）于 15 mL 尖底离心管中，分别加入 200μL 蛋白酶混合液（A 3.6），40℃孵育 2 h 后冷却至室温。静置 10 min 后，8000 rpm 离心 5 min，再利用滴管仔细吸除上层脂肪和中间酶解液，保留沉淀。

A.5.2.2 酸奶等酸性液体样品

分别称取 10 g（精确至 0.01 g）混匀后的液体样品和制备的对照品样品（A5.1）于 15 mL 尖底离心管中，加入 200μL 酸性蛋白酶（A 3.4），40℃孵育 2 h 后冷却至室温。静置 10 min 后，8000 rpm 离心 5 min，再利用滴管仔细吸除上层脂肪和中间酶解液，保留沉淀。

A.5.2.3 奶粉等粉末样品

分别称取 10 g（精确至 0.01 g）奶粉样品和制备的对照品样品（A5.1）于 50 mL 离心管中，分别加入 20 mL 水充分溶解。再加入 500μL 蛋白酶混合液（A3.6），40℃孵育 2 h 后冷却至室温。静置 10 min 后，8000 rpm 离心 5 min，再利用滴管仔细吸除上层脂肪和中间酶解液，保留沉淀。

注：对于离心后没有出现沉淀的液体及粉末样品，蛋白酶孵育 2 h 后再加入 500μL 脂肪酶（A 3.5），并 40℃孵育 2 h。

A.5.3 沉淀清洗

向 A 5.2 富集后的沉淀中加入 5 mL 水，充分分散，静置 10 min 后，8000 rpm 离心 5 min，沉淀清洗需重复 3 次以上，直至离心后吸取 100μL 上清液至 5 mL 离心管中，按照 6.4.2.7 的方法未检出葡萄糖含量，则底部沉淀可以进行下一步酶解。

A.5.4 酶解

按照 A5.3 处理后的样品和对照品加入 400μL 冷的氢氧化钾溶液（6.4.2.3.7），并冰水浴涡旋 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后，加入乙酸钠缓冲溶液 B（6.4.2.3.10，pH3.8）至 2 mL，最终 pH 应为 4-4.5 左右，随后加入 500μL 溶壁酶溶液（A3.7），准确记录此时体积为 V_4。将反应液在 50℃水浴锅中孵育 12-18 小时后，冷却至室温。移取 150μL（V_5）该酶解液至 2 mL 离心管中，加入 300μL 1,6-葡聚糖酶（6.4.2.3.13），80℃孵育 15 min 后，冷却至室温。再加入 300μL 混合酶溶液（6.4.2.3.14），记录总体积为 V_6，40℃孵育 1 h 后，冷却至室温。移取适量溶液过膜后进行检测。

注：冰水浴期间每次涡旋时间不应超过 10s。

酶空白溶液：移取 200 μL 氢氧化钾溶液（6.4.2.3.7）至 5 mL 离心管中，加入 0.8 mL 缓冲液 B（6.4.2.3.10，pH3.8），混匀后移取 120μL 加入 2 mL 离心管中再加入 30μL 溶壁酶溶液（A3.7），混匀。50℃孵育 12-18 小时后，冷却至室温。再加入 1,6-葡聚糖酶溶液（6.4.2.3.13）300μL，80℃孵育 15 min 后，冷却至室温。最后加入 300μL 混合酶溶液（6.4.2.3.14），40℃孵育 1 h，冷却至室温。移取适量溶液过膜后进行检测。

A.5.5 测定

同 6.4.2.6 和 6.4.2.7。

A.6 计算

食品中酵母 β-葡聚糖含量计算：

$$X_2 = \frac{\frac{c_1 - c_0}{c_2 - c_0} \times c' \times 0.9}{\frac{m_3}{V_4} \times \frac{V_5}{V_6}}$$

其中：

$$c' = \frac{m_4 \times P \times V_5}{0.9 \times V_4 \times V_6 \times 100}$$

当样品与对照品按照 A5.4 操作过程，二者的 V_4、V_5、V_6 完全相同时，以上公式可简化为：

$$X_2 = \frac{(c_1 - c_0) \times m_4 \times P}{(c_2 - c_0) \times m_3 \times 100}$$

其中：

X_2——食品中葡聚糖的含量，单位为克每千克（*g/kg*）；

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*）；

c_1——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_2——对照品酶解液的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（*g/L*）；

c’——对照品酶解后理论葡萄糖含量的计算值，单位为克每升（*g/L*）；

m_3——样品质量，单位为克（*g*）；

m_4——酵母 β-葡聚糖对照品的质量，单位为毫克（mg）；

V_4——溶壁酶酶解后酶解液的体积，单位为毫升（*mL=2.5*）；

V_5——从溶壁酶酶解液中移取的酶解液体积，单位为毫升（*mL=0.15*）；

V_6——完成所有酶解后的终体积，单位为毫升（*mL=0.75*）；

P——酵母 β-葡聚糖对照品的纯度，单位为克每百克（*g/100 g*）；

0.9——葡萄糖和酵母 β-葡聚糖换算系数。

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，结果保留三位有效数字。

A.7 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 15 %。

A.8 其他

当称样量为10 g时，方法检出限为0.033 g/kg，定量限为0.099 g/ kg。

A