中 华 人 民 共 和 国 农 业 行 业 标 准

饲料原料 酵母水解物和酿酒酵母细胞壁中甘露聚糖的测定

编制说明

中国农业科学院饲料研究所

2023 年 09 月

目录

一、标准制定背景及任务来源 3
1.1 标准制定背景 3
1.2 任务来源 4
1.3 起草单位 4
二、主要工作过程 4
三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据 5
3.1 标准编制原则 5
3.2 标准主要技术内容确定的依据 5
四、标准制定的主要内容与其依据 5
4.1 色谱分析条件的确定 5
4.2 水解条件的确定 7
4.3 单糖与多聚糖的换算 8
4.4 方法学考察 8
4.5 标准适用范围 18
4.6 结论 18
五、采用国际标准和国外标准的程度 18
六、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系 18
七、重大分歧意见的处理经过和依据 18
八、本标准作为强制性或推荐性标准的意见 18
九、贯彻标准的要求和措施建议 18
十、废止现行有关标准的建议 19
十一、其他应予说明的事项。 19

饲料原料 酵母水解物和酿酒酵母细胞壁中甘露聚糖的测定编制说明

一、标准制定背景及任务来源

1.1 标准制定背景

1.1.1 制定该项标准的目的和意义

我国酿酒酵母资源丰富，2008年废弃的酿酒酵母有82.06万吨。因此，近年来酵母源饲料产品的开发成为市场热点，引发了不少生产企业的加入，涉及的产品包括饲用酵母、酿酒酵母培养物、酵母水解物、酵母细胞壁等。2013年12月，国家农业部发布公告，正式将酿酒酵母细胞壁、酿酒酵母培养物、酵母水解物等加入《饲料原料目录》，并强制性要求其标识中必须有甘露聚糖的含量。甘露聚糖是酿酒酵母细胞壁中最主要的生物活性成分，具有提高免疫力；抑制肿瘤发生、抗辐射、抗氧化；并且其对霉菌毒素具有较强的吸附能力。由于酿酒酵母甘露聚糖具有同时吸附多种霉菌毒素的能力，添加量低且有效,而且在胃肠道内稳定性高，排出后可以被降解等特点，使酿酒酵母细胞壁等产品成为一类非常有前景的霉菌毒素吸附剂产品，而其中甘露聚糖的分子量及含量是衡量此类产品有效性的重要指标。为维护广大用户的利益、提高产品质量，开发相应甘露聚糖的检测方法对酿酒酵母及其加工产品进行检测，建立相应的检测标准势在必行。通过本标准的制定，可填补酿酒酵母及其加工产品中主要功效成分——甘露聚糖含量没有相关标准检测方法的空白，为确保该产品质量安全提供快速有效的检测方法，对保障饲料产品质量和畜产品安全的工作都具有重要意义。

1.1.2 国内外方法的研究概况

《饲料原料目录》中描述“酿酒酵母细胞壁”为：酿酒酵母经液体发酵后得到的菌体，再经自溶或外源酶催化水解，或机械破碎后，分离获得的细胞壁浓缩、干燥得到的产品；“酵母水解物”为：以酿酒酵母为菌种，经液体发酵得到的菌体，经自溶或外源酶催化水解后，未经提取可溶物浓缩干燥后的产品。强制性标识要求中均有甘露聚糖的标识要求。然而，酿酒酵母细胞壁及酵母水解物产品中甘露聚糖的检测方法至今仍未制定。

目前，国内外仍无测定酵母及其加工产品中甘露聚糖的标准方法。常见的甘露聚糖测定方法有比色法、酶法及酸水解法等。其中比色法只要化合物具备糖结构就能被比色法检测因此选择性太差；酶法则分析耗时长且操作繁琐重复性差。甘露聚糖在无机酸作用下能完全水解，定量地转化成相应的单糖。因此，将甘露聚糖通过酸水解得到甘露糖后再进行检测，最终换算得到甘露聚糖含量是目前应用最多的方法。水解后甘露糖的测定方法主要有高效液相色谱法和离子色谱法[1,2,3,4,5,6]。高效液相色谱法测定样品中的甘露糖可用糖分析柱和氨基键合相柱，此法操作便捷，通用性强，在生产企业中应用广泛，但所用示差折光检测器，响应值小、选择性较差、灵敏度较低。还有将酸水解后单糖需要经过柱前或柱后衍生化用反相高

效液相色谱进行分离，利用紫外或荧光检测器进行检测，经过衍生化后，单糖的分离选择性和检测灵敏度都得到增强[7, 8]，但是分析耗时长且操作繁琐。近年来，利用离子色谱法和脉冲安培检测器对水解后的单糖进行测定的方法在国内外得到了广泛应用，该方法具有方便快速、灵敏度高，选择性强等特点，该方法在专业检测机构中应用较多。

1.2 任务来源

《酿酒酵母及其加工产品中甘露聚糖的测定》是由全国饲料工业标准化技术委员会下达的检测方法标准制定任务，行业标准项目编号为2213010930261000。

1.3 起草单位

任务下达时，制定该标准的起草单位为中国农业科学院饲料研究所。在标准制定过程中专家建议参照已发布的行业标准NY-T3477-2019《饲料原料 酿酒酵母细胞壁》，补充生产企业采用较多的液相色谱检测的相关内容，因此邀请安琪酵母股份有限公司作为共同起草单位。

二、主要工作过程

方案制定：标准编制工作小组广泛收集国内标准、国际标准和国外先进标准中的相关标准，并检索了有关甘露聚糖检测方法的国内外文献，掌握了当前甘露聚糖含量分析现状，制定了标准检测方法试验草案，拟订工作计划和工作进度。

方法建立：按照拟定的试验草案，确定具体的检测分析步骤，进行相应指标分析、数据采集。并进行比对分析，筛选最佳的样品制备、酸水解、离子色谱方法的仪器分析等条件。并进行了线性、检测限和定量限、添加回收率等相关试验以确定方法最终是否具有可操作性和科学性。

标准编写：编制工作小组在方法实验过程中认真学习了GB/T1.1-2009标准化工作导则关于“标准的结构和编写”，GB/T20001.4“化学分析方法”等有关知识，弄清了化学分析方法的编写规则。在12月初完成了该方法标准的征求意见稿和编制说明。征求意见稿的方法名称为《酿酒酵母及其加工产品中甘露聚糖的测定》。

方法验证：邀请河南省兽药饲料监察所，国家饲料质量监督检验中心（北京），北京市饲料监察所等三家单位参加实验室比对工作，以验证和确定离子色谱检测方法的精密度。

征求意见：向包括第三方检测机构3家，饲料企业及酵母产品生产企业4家，各省部级饲料监察部门等共计15家单位发送了《征求意见稿》，回函并有意见或建议的单位15家；收回了15家20位专家填好的征求意见表20份，提出意见共98项，采纳72项，部分采纳7项，详情见《征求意见汇总表》。我们根据专家意见做了相应修改，补充了一些实验，完善了标准内容，形成标准预审稿。

标准初审：2020年11月我们邀请8位专家对本标准进行了预审，针对参会专家们提出

的 24 条意见进行了逐条修改。并且根据专家意见邀请安琪酵母股份有限公司有限公司作为共同起草单位，补充生产企业采用较多的液相色谱检测的相关内容。

补充内容后形成报批稿：将液相色谱方法补充到标准文本中，将方法建立及验证等数据补充到编制说明中。并邀请国家饲料质量监督检验中心（北京），湖北省产品质量监督检验研究院、三峡公共检验检测中心等三家单位参加实验室比对工作，以验证和确定液相色谱方法的回收率及精密度。进一步完善了标准内容，形成标准报批稿。

三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

3.1 标准编制原则

本标准的编写制定过程中以提高测试方法的选择性、准确度、精密度、检测限和分析效率为总原则，反映科学技术的先进成果和先进经验，遵循了标准制定过程中的先进性、经济性和适用性原则。

在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写规则及表述按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则的要求》[9]、GB/T 5009.1-2003 《食品卫生检验方法 理化部分 总则》[10]和 GB/T 20001.4-2001《标准编写规则 第 4 部分：化学分析方法》的要求编写[11]。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

3.2 标准主要技术内容确定的依据

目前常见的低聚糖测定方法有比色法和酶法。只要化合物具备糖结构就能被比色法检测因此没有选择性。酶法则分析耗时长、操作繁琐水解效率有时会受糖苷键的种类影响较大。将甘露聚糖通过酸水解得到甘露糖后利用色谱方法进行检测，是目前应用最多的方法。为了保证检测方法定性定量的准确性，本研究采用将低聚糖水解得到相应单糖后再进行检测，最终换算得到相应低聚糖含量的检测思路，将样品高温水解后，分别利用离子色谱和液相色谱进行单糖分离，利用脉冲安培检测器和示差折光检测器检测甘露糖含量并换算得到甘露聚糖的含量。

四、标准制定的主要内容与其依据

4.1 色谱分析条件的确定

4.1.1 离子色谱条件的确定

根据样品的特性，本研究在进行离子色谱分离条件优化时,不仅将甘露糖和葡萄糖做为分析目标，还将木糖、半乳糖也作为参考目标化合物，其中甘露糖为本方法检测对象甘露聚糖的水解产物，葡萄糖为酵母细胞壁中含量较高的葡聚糖的水解物，而半乳糖和木糖则

是酵母细胞壁中可能含有的单糖[12] [13]。单糖一般属于弱酸，因而在pH 12以上的淋洗液中就可以部分或者全部以阴离子形式存在。同时由于糖类物质都具有电化学活性基团，而使得脉冲安培检测器成为离子色谱仪测定糖类物质的最常见检测器。参考戴安公司提供的单糖分析参考方法，阴离子交换分离柱PAl0和PA20均可用于分离糖醇、单糖和双糖。虽然在李仁勇[1] 和李国强[14]等的论文里，都选用了CarboPac PA10，但是本研究经过对这两种分析对甘露糖等四种目标物的分离进行比较时发现，CarboPac PA10柱容量较高，但分析时间过长，且对甘露糖和木糖的分离效果欠佳。而CarboPac PA20虽然柱容量较低，但本研究样品中所含有的各种单糖都可以得到有效的分离。因此最终选取CarboPac Pa20色谱柱用于本方法的建立。

经过多次淋洗条件优化，发现NaOH浓度为4 mmol / L时这几种单糖的分离度较高，特别是葡萄糖和甘露糖得到了有效的分离。分离情况如图1所示。目标物分离后，为了确保色谱柱上没有杂质残留，再利用60 mmol / L 的NaOH冲洗6分钟和利用4 mmol / L的NaOH 冲洗9分钟进行再生，从而保护色谱柱和保证结果的重现性。

通过以上研究，本标准最终确定的色谱条件如下：

色谱柱：阴离子交换柱（PROD,COL,CP PA20，或能力相当者）柱长150 mm，内径3.0 mm；流动相：超纯水（A），200mmNaOH溶液（B）。流动相的梯度变化程序为0min(2%B)，15min(2%B)，15.01min(30%B)， 21min(30%)，21.01min(2%B)，30min(2%B)。流速：0.40 mL/min，柱温：30℃，进样量：25μL。

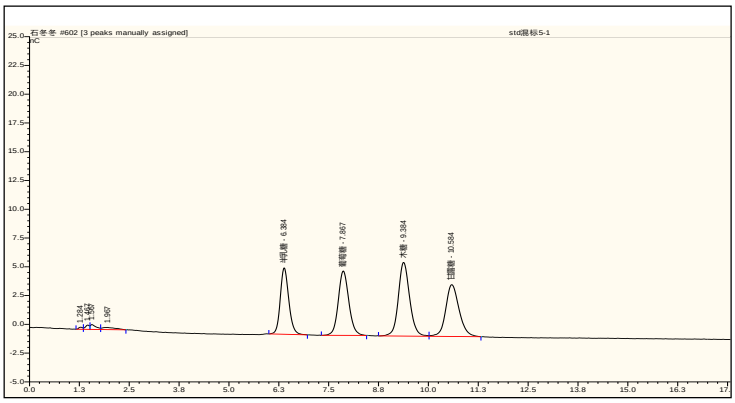

图 1 四种单糖标准溶液的离子色谱图（1 μ g/mL）

4.1.2 液相色谱色谱条件的确定

液相色谱为参照引用农业行业标准NY/T 3477-2019中的检测方法。该方法采用了Aminex HPX-87H色谱柱进行水解后单糖的分离，该柱由聚苯乙烯二乙烯苯树脂填装而成，对于单糖分离，配基交换是其主要分离机制，样品中糖的羟基与树脂的固定抗衡离子的结合，然后通过离子调节分配层析技术进行分离。与其他的糖分析柱相比，Aminex 柱的优点是样品无需进行衍生化，制备工作极少，具备高压稳定性，宽pH稳定性以及高柱效和选择性。据Chinnici等[15]报道Aminex HPX一87H色谱柱可以采用H_3PO_4或H_2SO_4为流动相对有

机酸和糖类组分进行分析。经比较本方法选用H_2SO_4作为流动相。在对样品的分离条件进行选择时，比较发现柱温较低时，葡萄糖与甘露糖较难实现分离，柱温达到65℃时，葡萄糖与甘聚糖基本实现分离，300 mm长柱可在20分钟内分离水解后样品中葡萄糖和甘露糖的混合物，分离情况如图2所示。

因此，本方法最终确定的色谱条件如下：

色谱柱：Aminex HPX-87H ion Exclusion（7.8 mm×300 mm　BIO-RAD，或能力相当者）；流动相：硫酸溶液（0.005 mol/L）；检测器：示差折光检测器；柱温：65℃；流速：0.6 mL/min；进样量：20 μL。

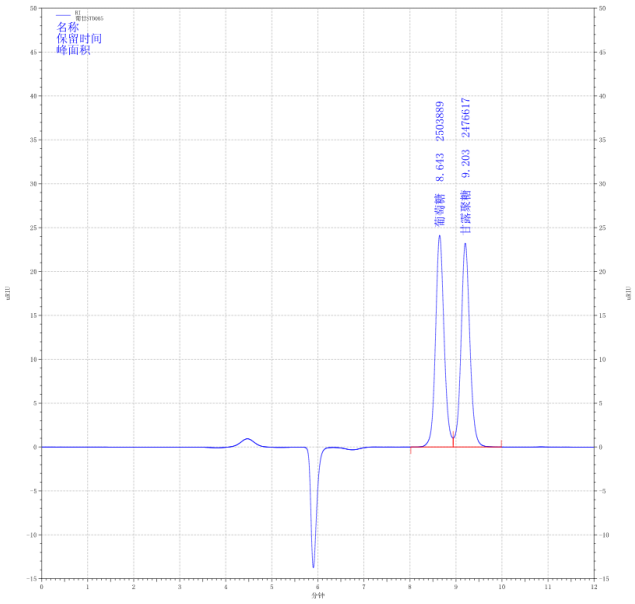

图 2 甘露糖和葡萄糖标准溶液（1000 μ g/mL）的液相色谱图

4.2 水解条件的确定

有文献报道的用于低聚糖水解的无机酸主要为硫酸和盐酸。我们分别对利用72％H_2SO_4和37%HCl水解样品中的甘露聚糖进行了研究。利用酵母源的甘露聚糖（CAS号9036-88-8，纯度≥99.9%）为标准对样品，对水解温度、酸的加入量以及水解时间三个主要因素进行了考察。最终确定硫酸的最佳水解条件是向样品中加入3.3mL的72％H_2SO_4，浸泡1 h，在样品中纤维素、多糖等充分溶解后，再加入适量水。为了避免挥发酸对设备的腐蚀，需将水解后溶液转移至250mL水解瓶中，将水解瓶封口后放入高压灭菌锅中，在121℃下处理2h后，甘露聚糖的水解效率趋于稳定并达到最大值，而随着温度进一步升高和时间延长，甘露聚糖的回收率会随之下降。盐酸的最佳水解条件是加入6.0ml盐酸（37%），在30℃水浴中处理45min，然后加入适量的水，在高压灭菌锅中121℃下处理1h时甘露聚糖的水解效率达到最大值。两种酸水解方法各有优缺点，硫酸水解甘露聚糖的水解后甘露糖的平均回收率为89.5±1.26%，盐酸水解后甘露糖的平均回收率为86.1±2.01%，但是硫酸水解的样品在上机前需加硫酸钡沉淀硫酸根离子，操作时间较长且繁琐，因此我们最终选取了盐酸水解方法为前处理方法。具体方法见标准草案。

4.3 单糖与多聚糖的换算

本研究的检测方法是利用甘露聚糖水解产生还原糖而定聚糖的含量的，由于多糖水解后除末端糖基外，其余糖基都多了一份水而形成单糖，所以单糖作为标准时，算出的多糖含量都要扣除水解中带进的水的量，即要乘以一校正系数。此系数的计算方法如公式1所示。其中：180为单糖的分子量，18为水的分子量，n为组成多糖的单糖个数。

$$X = \frac{180 \times n - 18 \times (n-1)}{180 \times n} \quad \cdots\cdots 1$$

研究表明酿酒酵母多糖均为大分子多糖，其中啤酒的分子量约为220kD，目前市售的部分酿酒酵母为原料的多糖产品虽然有些是经过部分水解的，但也是20个单糖左右组成的多糖，即n约为20~1000，按照以上公式计算出的系数约为0.905~0.900，因此，本研究最终将该系数确定为0.9，和目前企业和检测机构中通用的系数一致。

4.4 方法学考察

4.4.1 标准品的线性范围

a 离子色谱法

标准曲线系列溶液按照选定的仪器条件上机，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，曲线包括原点，离子色谱方法测定甘露糖的标准曲线如图3所示。表1为标准曲线的线性方程和相关系数。试验数据显示甘露糖的标准溶液浓度在0.5-12μg/mL 范围内呈良好的线性相关，相关系数>0.999。

表1 离子色谱线性方程和相关系数

序号	名称	线性回归方程	R^2
1	甘露糖	y=1.6566x	0.99968

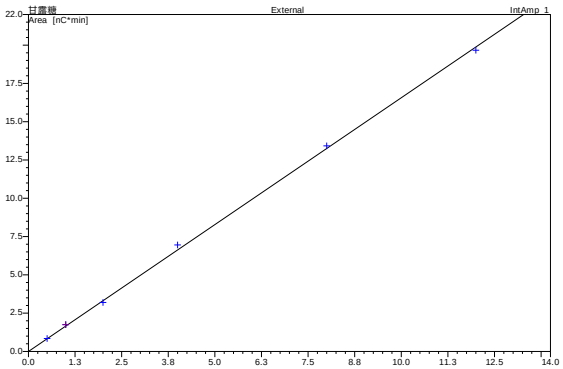

图 3 离子色谱测定甘露糖的标准曲线

b 液相色谱法

表2为液相色谱标准曲线的线性方程和相关系数。试验数据显示甘露糖的标准溶液浓度在200~1200μg/mL 范围内呈良好的线性相关，相关系数>0.999，液相色谱方法测定甘露糖的标准曲线如图4所示。

表2 液相色谱线性方程和相关系数

序号	名称	线性回归方程	R^2
1	甘露糖	y = 230.5x+565.01	0. 9999

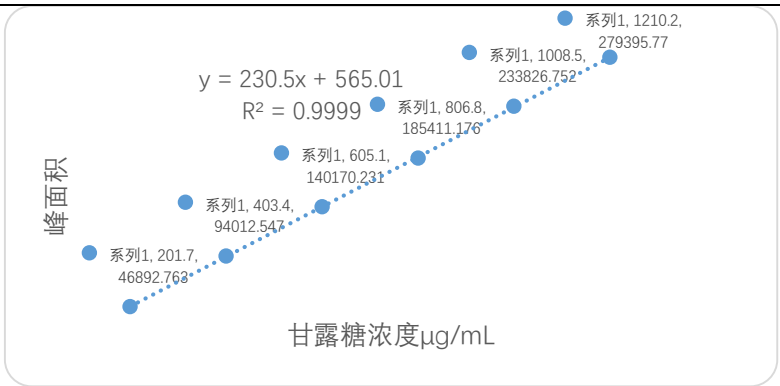

图 4 液相色谱测定甘露糖的标准曲线

4. 4. 2 检测限和定量限

a 离子色谱法

取检测限测试溶液进样，记录色谱图，信噪比（S/N）应不小于3。如果信噪比小于3，可适当提高甘露糖的浓度，直到信噪比大于3。检测结果显示，当甘露糖的浓度为0.01 mg/L时S/N为3.57，可见0.01 mg/L 可以作为仪器对甘露糖检测的最低检测限；取定量限测试溶液进样，记录色谱图，信噪比（S/N）应不小于10。测试结果显示，当甘露糖的浓度为0.03 mg/L时S/N为11.2，可见0.03 mg/L可以作为仪器对甘露糖检测的定量限。在称样质量为0.4 g，稀释定容体积为200 mL后又稀释50倍时，此方法甘露聚糖的检出限为0.02%，定量限为0.06%。样品中甘露聚糖的含量均远高于仪器检出限和定量限，且无法找到空白样品，因此未进行空白样品中添加甘露聚糖确定检测限和定量限的实验。

b 液相色谱法

取检测限测试溶液进样，记录色谱图，当甘露糖标准品分别为1.0085 μg/mL和3.0255 μg/mL时，分别对应仪器3倍信噪比和10倍信噪比，确定方法的检出限为1.0085 μg/mL，定量限为3.0255 μg/mL。在称样质量为0.4 g，稀释定容体积为200 mL时，此方法甘露聚糖的检出限为0. 05%，定量限为0. 15%。样品中甘露聚糖的含量均远高于仪器检出限和定量限，且无法找到空白样品，因此未进行空白样品中添加甘露聚糖确定检测限和定量限的实验。

4. 4. 3 标准溶液的稳定性

因本实验所涉及的标准溶液和标准储备液均为单糖溶液，易为微生物所利用，所以考察标准溶液稳定性的时间为两周，在此期间内利用离子色谱方法不定期反复进样，每次将冰箱0~4℃下冷藏保存的甘露糖标准储备液（1 mg/mL）从冰箱取出，充分回温，分别逐级稀释至5 ug/mL进样分析，结果见表3：

表3：甘露糖标准储备液稳定性考察

测定日期	甘露糖峰面积

2019.11.08	8.733
2019.11.12	8.727
2019.11.16	8.767
2019.11.20	8.734
2019.11.24	8.742

由上述测定的数据表明：甘露糖准储备液（1 mg/mL），置于冰箱0~4℃下冷藏保存16天后依然稳定，据此确定其有效期至少为两周。

4.4.4 方法的准确度和精密度

a 离子色谱法

离子色谱检测方法确定后，通过准确度和精密度试验对该方法进行验证。在已知浓度的酵母细胞壁样品中加入一定甘露聚糖对照品，多次重复测定，计算加标回收率及方法的精密度。本试验共设置3个添加浓度，在已知浓度为8.0%的0.2克试样中分别加入甘露聚糖标准品约15mg，20mg，25mg，添加后试样中甘露聚糖含量约为15.5%，18.0%，20.5%，三个添加后样品浓度均在市售酵母细胞壁样品浓度范围内。每浓度设置5个重复，进行回收率试验并计算批内精密度，重复3个批次试验，计算批间精密度，具体结果见表4-5。

表 4 离子色谱方法的的回收率及精密度试验结果(批内)

实测试样本底质量 mg	添加甘露聚糖标品质量 mg	实测甘露聚糖质量 mg	批内平均回收率 %	批内 RSD（n=5） %
16.05	15.38	31.16	99.13	7.26
16.04	20.88	31.44	85.17	3.03
16.13	25.42	35.23	84.79	4.53

表 5 离子色谱方法的回收率及精密度试验结果(批间)

实测试样本底质量 mg	添加甘露聚糖标品质量 mg	实测甘露聚糖质量 mg	批间平均回收率 %	批间 RSD(n=3) %
15.98	15.37	31.65	100.96	4.67
15.95	20.98	31.46	85.19	2.38
15.96	25.37	35.50	85.89	3.71

结果显示，甘露聚糖的回收率均在84.79%～100.96%之间，相对标准偏差除低浓度样品批内相对偏差超过了5%以外（7.26%），大部分在10%以内；分析其原因发现是因为稀释倍数较大，接近了标准曲线的低限，造成定量的重复性不够理想。在做批间试验时，调整了稀释倍数，所以批间相对标准偏差均≤4.67%。说明该方法对不同含量的甘露聚糖的测定均有较好的准确度和精密度。

b 液相色谱法

液相色谱检测方法确定后，将 6 份供试样品每份称样 5 次，按标准中的方法进行样品处理，计算结果的精密度（RSD）。结果见表 6，检测结果精密度均＜2%。

表 6 液相色谱方法精密度实验结果

序号	甘露聚糖含量（%）						RSD/%（n=5）
	1	2	3	4	5	平均	
1	9.66	9.70	9.54	10.00	9.52	9.69	1.99
2	7.46	7.30	7.51	7.67	7.42	7.47	1.79
3	9.46	10.00	9.78	9.73	9.79	9.75	1.98
4	22.5	22.1	21.8	21.8	22.0	22.0	1.31
5	16.4	16.8	16.5	16.7	16.5	16.6	0.98
6	18.2	18.5	18.6	17.8	17.9	18.2	1.96

选择酵母水解物和酵母细胞壁进行甘露糖加标回收实验，按样品中甘露糖含量的 80%、100%、120%添加甘露糖标准品，计算回收率和精密度。结果见表 7，回收率在 85.5%～89.1%之间，回收率的精密度≤2.1%。

表 7 液相色谱方法回收率实验结果

型号	加标水平	添加量 mg	称样质量 g	实测值 mg/g	平均值 mg/g	回收率%	平均值%	RSD/%
酵母水解物	0%	0	0.4019	107.301	107.620	/	/	2.0
		0	0.4083	107.828		/		
		0	0.4014	106.019		/		
		0	0.4330	111.140		/		
		0	0.4003	105.810		/		
	80%	37.8	0.3975	189.854	189.185	86.5	88.3	1.9
		37.8	0.4216	187.190		88.7		
		37.8	0.4096	190.512		89.8		
	100%	47.2	0.4329	199.919	203.734	84.7	85.5	1.3
		47.2	0.4308	202.764		86.8		
		47.8	0.4032	208.520		85.1		
	120%	56.2	0.4013	230.477	230.051	87.7	87.3	1.7
		57.3	0.4012	234.029		88.5		
		56.3	0.4086	225.646		85.7		
酵母细胞壁	0%	0	0.4035	249.732	244.516	/	/	1.3
		0	0.4065	245.040		/		
		0	0.4063	241.923		/		
		0	0.4010	241.956		/		
		0	0.4050	243.928		/		
	80%	88.3	0.4046	437.791	432.707	88.6	89.7	2.1
		87.8	0.3994	439.387		88.6		
		87.5	0.4558	420.943		91.9		
	100%	109.8	0.4090	478.326	477.686	87.1	87.7	0.8
		109.6	0.4116	477.512		87.5		

	110.5	0.4202	477.219		88.5		
120%	132.9	0.4084	530.485	535.214	87.9	89.1	1.2
	132	0.4040	536.694		89.4		
	132.3	0.4050	538.461		90.0		

4.4.5 样品检测和允许差

a 离子色谱法

选取市售安琪酵母、法国乐斯福、唐山拓普等厂家生产的不同类型的酵母细胞壁和酵母水解物产品18个，分别按照本标准中的液相色谱方法和离子色谱方法对其进行检测，离子色谱方法具体结果如表8所示，样品离子色谱图如图5-6。

表8 市售产品中甘露聚糖含量的离子色谱检测结果

样品编号	产品名称	标示量%	实测平均值%	相对偏差（%）
wy201604963	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	13.85	4.11
wy201604964	酵母水解物	≥5.0	6.85	5.43
wy201604965	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	19.31	2.36
wy201604966	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	13.57	3.07
wy201604967	酵母水解物	5.0-13.0	10.96	2.76
wy201604968	酵母水解物	5.0-13.0	9.78	3.02
wy201604969	酵母水解物	5.0-13.0	11.01	2.78
wy201604970	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	16.15	4.49
wy201604971	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	17.71	0.78
wy201604972	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	15.26	4.11
wy201604973	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	15.24	3.34
wy201604974	酵母水解物	5.0-13.0	7.58	1.98
wy201604975	酵母水解物	5.0-13.0	9.05	4.22
wy201604976	酵母水解物	5.0-13.0	8.88	0.94
wy201604977	酵母水解物	5.0-13.0	7.74	1.40
wy201604978	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	21.37	2.62
wy201604979	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	18.07	2.14
wy201604980	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	19.70	1.78

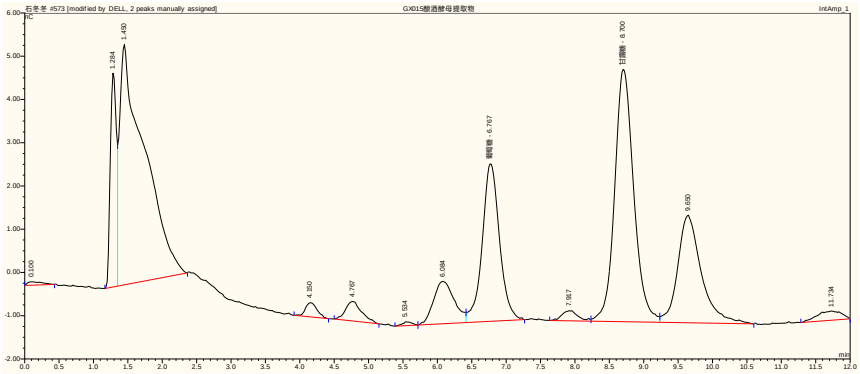

图 5 酵母水解物的离子色谱图

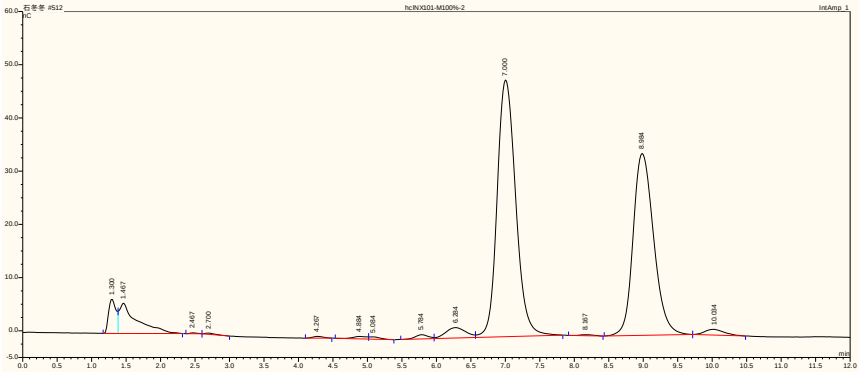

图 6 酵母细胞壁的离子色谱图

由以上样品的色谱图我们可以看出，水解后的酿酒酵母及其加工产品中除了含有较高的葡萄糖和甘露糖以外，可能还含有少量的半乳糖、木糖等其他单糖，这些单糖在离子色谱中都获得了有效的分离，因此，选用对单糖分离度较高的离子色谱法用于酿酒酵母及其加工产品中甘露聚糖的检测是较合理的。

通过对市售样品的检测发现，平行样品间最大的标准偏差为5.43%。与回收率及精密度试验中相对偏差均小于10%结果一致。因此，确定本方法的精密度为两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

b 液相色谱法

18个市售样品液相色谱方法检测结果如表9所示，样品液相色谱图如图7-8。

表9 市售产品中甘露聚糖含量的液相色谱检测结果

样品编号	产品名称	标示量%	实测平均值%	相对偏差（%）
wy201604963	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	16.23	0.62
wy201604964	酵母水解物	≥5.0	8.58	0.64
wy201604965	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	20.92	1.46
wy201604966	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	15.30	0.26
wy201604967	酵母水解物	5.0-13.0	12.29	0.37
wy201604968	酵母水解物	5.0-13.0	11.26	2.04
wy201604969	酵母水解物	5.0-13.0	12.56	2.07
wy201604970	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	18.85	2.55
wy201604971	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	18.70	2.30

wy201604972	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	17.95	0.22
wy201604973	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	17.63	1.16
wy201604974	酵母水解物	5.0-13.0	8.60	4.60
wy201604975	酵母水解物	5.0-13.0	10.92	1.79
wy201604976	酵母水解物	5.0-13.0	9.26	0.38
wy201604977	酵母水解物	5.0-13.0	8.34	1.86
wy201604978	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	23.62	0.47
wy201604979	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	20.21	2.60
wy201604980	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	21.24	0.40

通过利用液相色谱方法对市售样品的检测发现，平行样品间最大的标准偏差为4.60%。而在回收率及精密度试验中，批内和批间重复的相对偏差其它均小于10%。因此，确定本方法的精密度为两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

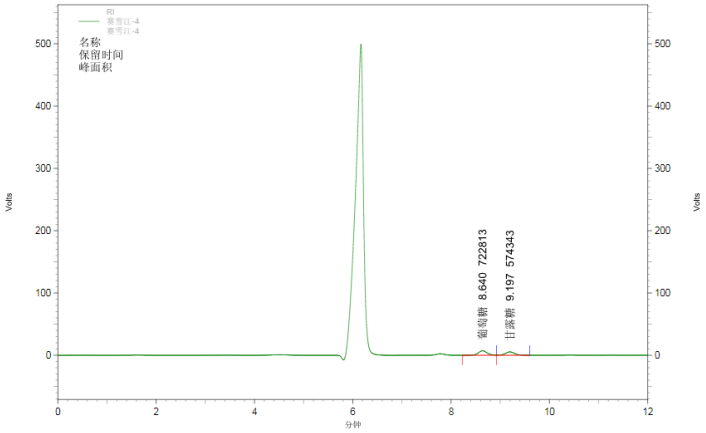

图7 酵母水解物的液相色谱图

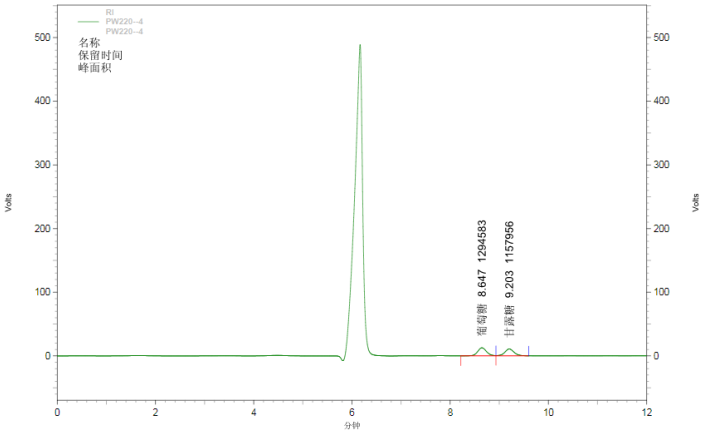

图8 酵母细胞壁的液相色谱图

为了确定离子色谱和液相色谱两种方法的一致性，将以上18份市售样品两种方法检测结果进行了比较，比较结果如表10所示。

表10 液相色谱和离子色谱两种检测方法的结果比较

样品编号	产品名称	标示量%	液相色谱结果（%）	离子色谱结果（%）	平均值（%）	相对偏差（%）
wy201604963	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	16.23	13.85	15.04	7.91
wy201604964	酵母水解物	≥5.0	8.58	7.35	7.97	7.72
wy201604965	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	20.92	19.31	20.12	4.00
wy201604966	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	15.30	13.57	14.43	6.01
wy201604967	酵母水解物	5.0-13.0	12.29	10.96	11.63	5.72
wy201604969	酵母水解物	5.0-13.0	11.26	9.78	10.52	7.06
wy201604970	酵母水解物	5.0-13.0	12.56	11.01	11.78	6.60
wy201604971	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	18.85	16.15	17.50	7.73
wy201604972	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	18.70	17.71	18.21	2.72
wy201604973	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	17.95	15.26	16.61	8.10
wy201604974	酿酒酵母细胞壁	≥15.0	17.63	15.24	16.44	7.27
wy201604975	酵母水解物	5.0-13.0	8.60	7.58	8.09	6.34
wy201604976	酵母水解物	5.0-13.0	10.92	9.05	9.99	9.36
wy201604977	酵母水解物	5.0-13.0	9.26	8.88	9.07	2.09
wy201604978	酵母水解物	5.0-13.0	8.34	7.74	8.04	3.76
wy201604979	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	23.62	21.37	22.50	5.00
wy201604980	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	20.21	18.07	19.14	5.60
wy201604981	酿酒酵母细胞壁	≥20.0	21.24	19.70	20.47	3.77

由表9结果可以看出，两种检测方法的结果一致性较好，离子色谱检测结果略低于液相色谱检测结果，同一样品两种方法检测的最大标准偏差为9.36%，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10 %。

本研究又选取安琪酵母有限公司不同生产厂不同生产工艺的酵母细胞壁产品20个，酵母水解物5个，利用液相色谱方法对未水解的样品中的甘露糖含量进行了检测，具体结果如表11所示。

表11 酵母细胞壁及酵母水解物中甘露糖含量检测结果

生产厂	产品名称	样品编号	甘露糖（%）
A	酵母细胞壁	WY201715501	0.26
	酵母细胞壁	WY201715502	0.19
	酵母细胞壁	WY201715503	0.95
	酵母细胞壁	WY201715504	1.26
B	酵母细胞壁	WY201801	0.81
	酵母细胞壁	WY201802	0.63
	酵母细胞壁	WY201803	0.06
	酵母细胞壁	WY201804	0.06
C	酵母细胞壁	WY201805	1.45
	酵母细胞壁	WY201806	1.25
	酵母细胞壁	WY201807	0.09
	酵母细胞壁	WY201808	0.09
D	酵母细胞壁	WY201809	0.03

	酵母细胞壁	WY201810	0.05
	酵母细胞壁	WY201811	0.08
	酵母细胞壁	WY201812	0.08
E	酵母细胞壁	WY201813	0.25
	酵母细胞壁	WY201814	0.05
	酵母细胞壁	WY201815	0.04
	酵母细胞壁	WY201816	0.03
A	酵母水解物	WY202112	0.15
B	酵母水解物	WY202113	0.13
C	酵母水解物	WY202114	0.16
D	酵母水解物	WY202115	0.08
E	酵母水解物	WY202116	0.32

由表11结果可知，大部分样品甘露糖含量很低，只有6个酵母细胞壁样品的甘露糖含量超过了0.5%，这些样品的统一特征是水解程度较高，溶解性较好，其中游离的甘露糖是水解后自然产生，而非添加。这些样品的甘露聚糖含量均≥21%，减去游离甘露糖后，其中甘露聚糖的含量仍然可以达到标识要求，就本研究所涉及的样品检测结果显示，水解中自然产生的甘露糖并未影响样品合格性的判定。

4.4.6 单糖掺杂样品的鉴别

因甘露聚糖具有吸附霉菌毒素等功能，其含量是衡量酿酒酵母及其加工产品有效性的重要指标，因此存在人为掺入单糖冒充低聚糖的可能。为了确认本方法对此类产品掺入单糖的鉴别效果，我们在样品中分别添加了甘露糖、半乳糖、木糖和葡萄糖，并对水解前和水解后的甘露糖检测数据进行了比较，离子色谱图如图9-12，检测结果如表12所示。

表12 酿酒酵母中添加单糖的检测结果

样品	添加单糖含量	水解前甘露糖含量	水解后甘露糖含量	水解前后甘露糖的差值	酿酒酵母中甘露糖含量
A+甘露糖	5.01%	5.08%	15.27%	5.03%	10.24%
A+半乳糖	5.00%	/	10.21%	0.03%	10.24%
A+木糖	5.02%	/	10.31%	0.07%	10.24%
A+葡萄糖	4.98%	/	10.19%	0.05%	10.24%

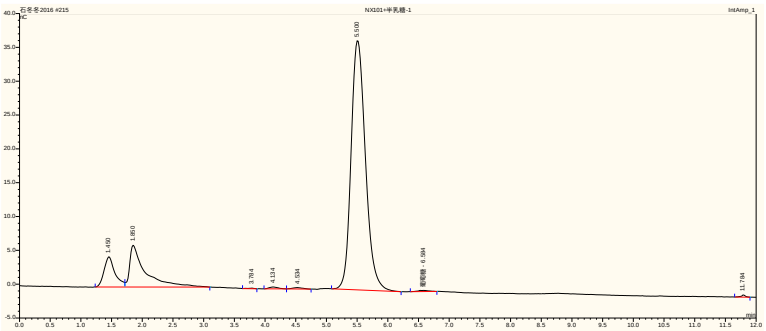

图 9 添加半乳糖的酿酒酵母水解前的色谱图

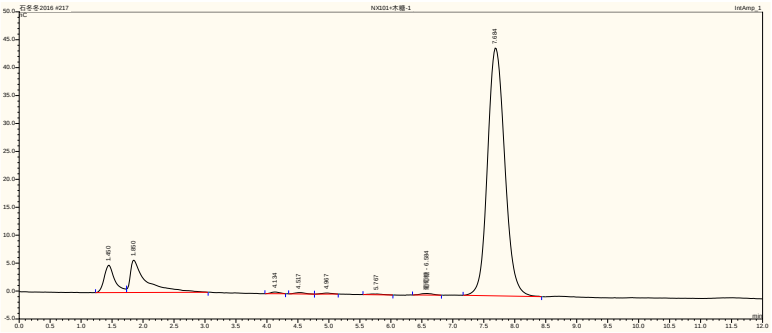

图 10 添加木糖的酿酒酵母水解前的色谱图

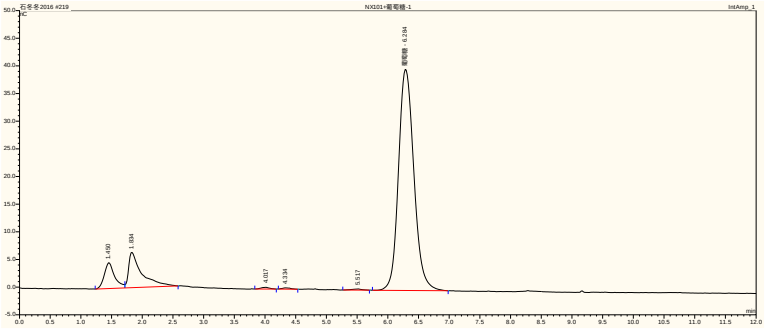

图 11 添加葡萄糖的酿酒酵母水解前的色谱图

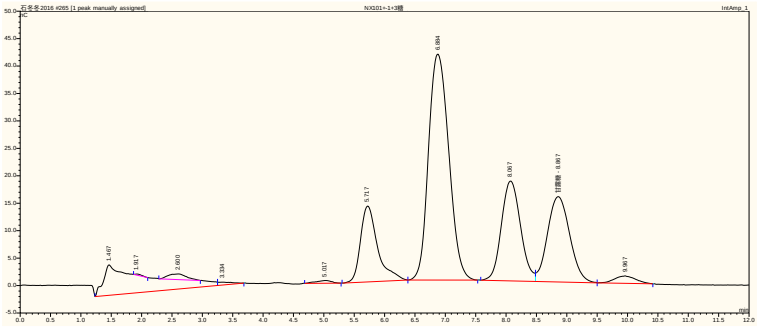

图12 添加半乳糖、木糖、葡萄糖的酿酒酵母水解后色谱图

由表12的比较结果可以看出，单糖在水解过程中没有损失，利用本方法所建立的离子色谱方法分别对水解前后的样品进行检测，可以有效的鉴别掺入了以上几种单糖的掺假样品。

4.4.7 再现性

取酵母水解物、酿酒酵母细胞壁、酿酒酵母及添加不同浓度甘露聚糖标准品的酵母水解物试样各适量，分别由河南省兽药饲料监察所，国家饲料质量监督检验中心（北京）,北京市饲料监察所三家单位利用离子色谱方法进行验证，检测结果的一致性较好。可以看出不同实验室、不同操作人员、不同仪器完成的结果相对标准偏差均不大于 15%。

初审专家会后，听取专家意见，将液相色谱检测方法加入本标准，为了确认液相色谱法的再现性，取 6 份酵母水解物、酿酒酵母细胞壁试样各适量，分别由三峡公共检验检测中心，国家饲料质量监督检验中心（北京）,湖北省产品质量监督与检验研究院三家单位进行验证，检测结果的一致性较好。可以看出不同实验室、不同操作人员、不同仪器完成的结果相对标准偏差均不大于 15%。

4.5 标准适用范围

本标准原定名称为酿酒酵母及其加工产品中甘露聚糖的测定，征求专家意见和经预审会专家讨论后，决定将原有标准的名称进行修改，检测范围进行缩减，缩减的原因如下：

a 目前饲料原料酿酒酵母的产品标准中并未有标识甘露聚糖含量的要求，因此并没有检测酿酒酵母中甘露聚糖的需要，因此将酿酒酵母从检测范围中删除；

b 酿酒酵母培养物是一类培养基差别比较大的样品，产品基质复杂，该类样品水解后所含单糖种类和含量差别都比较大，利用本方法进行检测时，培养基中有些成分可能会影响甘露糖的检测结果，因此将酵母培养物从检测范围中删除。

通过对实际样品的检测和样品的添加回收试验，证明本方法可适用于酵母水解物、酿酒酵母细胞壁中甘露聚糖的检测。因此，为了与本标准的适用范围相一致，特将本标准的名称由原来的名称《酿酒酵母及其加工产品中甘露聚糖的测定》，修改为《饲料原料酵母水解物和酿酒酵母细胞壁中甘露聚糖的测定方法》。

4.6 结论

以上结果表明，本标准建立的测定甘露聚糖的离子色谱-脉冲安培检测法和液相色谱-示差折光检测法，其色谱条件易于掌握，仪器性能稳定，测试数据重复性好，回收率范围、精密度和准确度均能满足分析实验要求，能够满足酵母水解物和酿酒酵母细胞壁产品中甘露聚糖含量的测定要求。

五、采用国际标准和国外标准的程度

没有采用国际标准。

六、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

本标准与有现行的法律、法规和强制性标准没有冲突。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编写过程中没有重大意见分歧。

八、本标准作为强制性或推荐性标准的意见

建议将本标准作为推荐性标准发布实施，并加强标准的宣贯。

九、贯彻标准的要求和措施建议

本标准在制定过程中，严格贯彻国家有关方针、政策、法规和规章，严格执行国家标

准的规定，各项技术内容不违背我国目前颁布的相关法律、法规和标准，政策性和协调性较强；标准制定单位收集了相关资料和标准，结合农业部例行监测和监督抽查的实际情况，编制完成该标准。本标准具有较强的科学性、合理性和可行性。本标准严格按照GB/T 1.1-2020的要求，技术内容叙述无误，文字表达准确、简明、易懂，标准结构布局合理，层次划分符合逻辑，规范性强。

十、废止现行有关标准的建议

无。因目前国内没有相关标准。

十一、其他应予说明的事项。

无。

参考文献

[1] 李仁勇,梁立娜,牟世芬,等.离子色谱-脉冲安培检测法测定酵母细胞壁中 β-葡聚糖和甘露寡糖[J].食品与发酵工业,2008,34(12):147-151.

[2] 陈少峰,望忠福,高效液相色谱法测定酵母葡聚糖[J]. 食品科技, 2009(7):278-280.

[3] 林钦恒,郑家概,蔡大川,等.柱前衍生化 HPLC 法测定酵母细胞壁中的甘露聚糖与 β-葡聚糖[J].分析测试学报,2015, 34(1):106-110.

[4] Panagiotopoulos C, Sempéré R, Lafont R, et al.Sub-ambient temperature effects on the separation of monosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection: Application to marine chemistry[J]. Journal of Chromatography A,2001,920(1-2):13-22.

[5] 袁忠海,吴道澄,赵燕,等.高效液相色谱法测定魔芋精粉中葡甘露聚糖的含量及其单糖组成[J].中国中药杂志, 2003,28(07):621-624.

[6] NY/T 2279-2012 食用菌中岩藻糖、阿糖醇、海藻糖、甘露醇、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、核糖的测定离子色谱法.

[7] 张倩男,徐方敏,连之娜,等.柱前衍生反相高效液相色谱法测定田菁种子水解液中的单糖[J].林产化学与工业,2020,(3):31-38.

[8] T/QBAA 001-2023 酿酒酵母培养物中甘露聚糖含量的测定反相高效液相色谱法.

[9] GB/T 1. 1-2009 标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则的要求.

[10] GB/T 5009. 1-2003 食品卫生检验方法 理化部分 总则.

[11] GB/T 20001. 4-2001 标准编写规则第 4 部分：化学分析方法.

[12] 姜翔之,罗浩铭,周婷婷,等. 酵母多糖提取物 HPLC 指纹图谱的研究[J].特产研究,2013(1):46-50.

[13] 乐胜锋,王尉,王雅萱,等.离子色谱-脉冲安培法测定芦荟多糖中 7 种单糖的含量[J].色谱,2019 Vol.37No.3319～324

[14] 李国强,谭卓杰,李韵仪,等.离子色谱法测定土壤中单糖含量中国土壤与肥料[J].2019(1):196-200.

[15] Chinnici F, Spinabelli U, Riponi CAmati A. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography[J].Journal of Food Composition & Analysis.2005,18(2)：121-130.