



中华人民共和国国家标准

GB ××××—××××

食品安全国家标准

食品中酵母 β -葡聚糖的测定

(讨论稿)

201×-××-××发布

201×-××-××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

食品中酵母 β -葡聚糖的测定

1 范围

本标准规定了调制乳、风味发酵乳、调制乳粉和婴幼儿配方乳粉中不溶性酵母 β -葡聚糖含量的测定方法。

本标准适用于调制乳、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。

2 原理

本方法利用蛋白酶和/或脂肪酶去除样品中的脂肪、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、 β - (1,6)-葡聚糖酶、 β - (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 -内酯和过氧化氢。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反应生成红色醌亚胺(GODPOD法)。利用分光光度计测定葡萄糖的含量，再计算出样品中酵母 β -葡聚糖的含量。

3 试剂和材料

注：除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 不溶性酵母 β -葡聚糖对照品，已知纯度，且纯度 $\geq 70\%$ 。
- 3.1.2 无水葡萄糖，纯度 $\geq 99\%$
- 3.1.3 碱性蛋白酶，酶活力 ≥ 240000 U/g。
- 3.1.4 中性蛋白酶，酶活力 ≥ 80000 U/g。
- 3.1.5 酸性蛋白酶，酶活力 ≥ 50000 U/g。
- 3.1.6 脂肪酶，酶活力 ≥ 20000 U/g。
- 3.1.7 乙二胺四乙酸四钠二水合物， $C_{10}H_{14}N_2Na_4O_8 \cdot 2H_2O$ 。
- 3.1.8 三羟甲基氨基甲烷(tris)， $C_4H_{11}NO_3$ 。
- 3.1.9 冰醋酸， CH_3COOH 。
- 3.1.10 无水乙酸钠， CH_3COONa 。
- 3.1.11 氯化钠， $NaCl$ 。
- 3.1.12 氢氧化钾， KOH 。
- 3.1.13 氢氧化钠， $NaOH$ 。
- 3.1.14 盐酸， HCl 。
- 3.1.15 溶壁酶，酶活力 ≥ 200 U/mg。
- 3.1.16 β - (1,6)-葡聚糖酶，酶活力 ≥ 2 U/mg。
- 3.1.17 β - (1,3)-葡聚糖酶和葡萄糖苷酶混合酶，酶活力分别 ≥ 100 U/mL 和 20U/mL。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 葡萄糖标准溶液(2.0 g/L)：称取 0.20 g (精确至 0.001 g) 经过 98℃~100℃干燥 2 h 的葡萄糖

- (3.1.2), 加水溶解并定容至 100 mL, 摇匀。
- 3.2.2 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(3.2.1) 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。
- 3.2.3 蛋白酶混合溶液: 等体积混合碱性蛋白酶(3.1.3) 和中性蛋白酶(3.1.4), 4℃保存。
- 3.2.4 氢氧化钾溶液(2.0 mol/L): 称取 11.2 g 氢氧化钾(3.1.12), 水充分溶解后, 定容至 100 mL, 混匀后, 4℃冷藏保存。
- 3.2.5 氢氧化钠溶液(1.0 mol/L): 称取 4.0 g 氢氧化钠(3.1.13), 水充分溶解后, 定容至 100 mL, 并混匀。
- 3.2.6 盐酸溶液(1.0 mol/L): 量取 9 mL 盐酸(3.1.14) 至盛有 80 mL 水的容量瓶中, 充分混匀后, 以水定容并混匀。
- 3.2.7 乙酸钠缓冲溶液 A(0.2 mol/L): 分别称取 5.25 g 无水乙酸钠(3.1.10) 和 2.16 g 冰醋酸(3.1.9) 至 400 mL 水中, 氢氧化钠溶液(3.2.5) 或冰醋酸(3.1.9) 调节 pH 至 5.0 ± 0.05 , 水定容至 500 mL, 并混匀。
- 3.2.8 乙酸钠缓冲溶液 B(1.2 mol/L): 分别称取 4.96 g 无水乙酸钠(3.1.10) 和 32.32 g 冰醋酸(3.1.9) 至 400 mL 水中, 氢氧化钠溶液(3.2.5) 或冰醋酸(3.1.9) 调节 pH 至 3.8 ± 0.05 , 定容至 500 mL, 并混匀。
- 3.2.9 缓冲溶液 C(pH7.5): 溶解 1.212 g 三羟甲基氨基甲烷(3.1.8)、1.169 g 氯化钠(3.1.11) 以及 0.416 g 乙二胺四乙酸四钠二水合物(3.1.7) 于 90 mL 纯净水中。用盐酸溶液(3.2.6) 或氢氧化钠溶液(3.2.5) 调节 pH 至 7.5 ± 0.05 , 最后水定容至 100 mL, 并混匀。
- 3.2.10 溶壁酶溶液(5 u/μL): 称取适量溶壁酶至含有 10% 缓冲溶液 C(3.2.9) 中, 使溶壁酶最终浓度为 5 u/μL (-15℃条件下可保存 1 年, 不应反复冻融)。
- 3.2.11 β-(1,6)-葡聚糖酶溶液: 溶解适量 β-(1,6)-葡聚糖酶(3.1.16) 于乙酸钠缓冲溶液 A(3.2.7) 中, 终浓度为 1 u/300μL (悬浊液, -15℃条件下可保存 60 天, 不应反复冻融)。
- 3.2.12 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(3.1.7), 加入适量乙酸钠缓冲溶液 A(3.2.7) 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, 不应反复冻融)。
- 3.2.13 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。
- 3.2.14 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。
- 3.2.15 GODPOD 工作液: 移取 20 mL 稀释后的缓冲液(3.2.13) 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(3.2.13), 避光 4℃保存, 有效期 3 个月(-20℃保存, 有效期 12 个月, 不应反复冻融)。
- 注: 3.2.9~3.2.14 也可使用商品化试剂或试剂盒。

4 仪器和设备

- 4.1 实验室常用设备。
- 4.2 恒温水浴锅。
- 4.4 分光光度计。

5 分析步骤

5.1 对照品的制备

称取 3 mg~10 mg 已知纯度酵母 β -葡聚糖对照品 (3.1.1, 精确至 0.001g, 与待测样品中酵母 β -葡聚糖含量相近) 于尖底离心管中, 加入 10 g (精确至 0.01 g) 空白调制乳、风味发酵乳、调制乳粉或婴幼儿配方乳粉, 充分混匀。

4.2 富集

4.2.1 调制乳

分别称取 10 g (精确至 0.01 g, 或相当于 3 mg~10 mg 酵母 β -葡聚糖的样品质量) 混匀后的调制乳样品和制备的相应基质对照品样品 (5.1) 于 15 mL 尖底离心管中, 分别加入 200 μ L 蛋白酶混合液 (2.6), 40℃ 孵育 2 h 后冷却至室温。静置 10 min 后, 8000 r/min 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。

4.2.2 风味发酵乳

称取 10 g (精确至 0.01 g, 或相当于 3 mg~10 mg 酵母 β -葡聚糖的样品质量) 混匀后的风味发酵乳样品和制备的相应基质对照品样品 (5.1) 于 15 mL 尖底离心管中, 加入 200 μ L 酸性蛋白酶 (3.1.5), 40℃ 孵育 2 h 后冷却至室温。静置 10 min 后, 8000 r/min 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。

4.2.3 调制乳粉和婴幼儿配方乳粉

分别称取 10 g (精确至 0.01 g, 或相当于 3 mg~10 mg 酵母 β -葡聚糖的样品质量) 乳粉样品和制备的相应基质对照品样品 (5.1) 于 50 mL 离心管中, 分别加入 20 mL 水充分溶解。再加入 500 μ L 蛋白酶混合液 (3.2.11), 40℃ 孵育 2 h 后冷却至室温。静置 10 min 后, 8000 r/min 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酵母 β -葡聚糖沉淀的样品或脂肪含量 $\geq 10\%$ 的样品, 蛋白酶孵育 2 h 后再加入 500 μ L 脂肪酶 (2.5), 并 40℃ 孵育 2 h。或称取 10 g 样品后, 参考 GB5413.6-2010 中 6.1 步骤去除样品中多余脂肪后, 再利用蛋白酶去除多余蛋白质。

4.3 沉淀清洗

向 4.2 富集后的沉淀中加入 5 mL 水, 充分分散, 静置 10 min 后, 8000 r/min 离心 5 min, 沉淀清洗需重复 3 次以上, 直至离心后吸取 100 μ L 上清液至 5 mL 离心管中, 按照 4.5.2 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。

4.4 酶解

按照 4.3 处理后的样品和对照品加入 400 μ L 冷的氢氧化钾溶液 (3.2.4), 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 (3.2.8, pH3.8) 至 2 mL, 随后加入 500 μ L 溶壁酶溶液 (3.2.10), 记录此时总体积为 V_1 。将反应液在 50℃ 水浴锅中孵育 12-18 小时后, 冷却至室温。移取 150 μ L (V_2) 该酶解液至 2 mL 离心管中, 加入 300 μ L β -(1,6)-葡聚糖酶溶液 (3.2.11), 80℃ 孵育 15 min 后, 冷却至室温。再加入 300 μ L 混合酶溶液 (3.2.12), 记录总体积为 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。

酶空白溶液: 移取 200 μ L 氢氧化钾溶液 (3.2.4) 至 5 mL 离心管中, 加入 0.8 mL 缓冲液 B (3.2.8, pH3.8), 混匀后移取 120 μ L 加入 2 mL 离心管中再加入 30 μ L 溶壁酶溶液 (3.2.10), 混匀。50℃ 孵育 12h~18 h 后, 冷却至室温。再加入 300 μ L β -(1,6)-葡聚糖酶溶液 (3.2.11), 80℃ 孵育 15 min 后, 冷却至室温。最后加入 300 μ L 混合酶溶液 (3.2.12), 40℃ 孵育 1 h, 冷却至室温。移取适量溶液过膜后进行检测。

4.5 测定

4.5.1 标准曲线的绘制

依次移取 100 μL 葡萄糖系列标准溶液 (3.2.2) 至 5 mL 离心管中, 再加入 3 mL GODPOD 工作液 (3.2.15), 40 °C 水浴 20 min。移出水浴, 冷却至室温后, 过膜后全部转移至 1 cm 比色皿中, 以 GODPOD 工作液 (3.2.15) 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。

4.5.2 样品溶液的测定

分别移取 100 μL 经 4.4 步骤处理后的样品溶液、对照品溶液、酶空白溶液, 以及 4.3 处理后的上清液至 5 mL 离心管中, 再分别加入 3 mL GODPOD 工作液 (3.2.15), 40 °C 水浴 20 min。移出水浴, 冷却至室温后, 过膜, 全部转移至 1 cm 比色皿中, 以 GODPOD 工作液 (3.2.15) 为空白, 利用分光光度计在 510 nm 处测量吸光度, 并记录。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*)。

6 分析结果的表达

食品中酵母 β-葡聚糖含量计算:

$$X = \frac{(c - c_0)/(c_S - c_0) \times c_S' \times 0.9}{m/V_1 \times V_2/V_3} \dots \dots \dots (1)$$

式中:

- X*——食品中葡聚糖的含量, 单位为克每千克 (g/kg);
- c*——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);
- c*_S——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*_S'——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);
- 0.9——葡萄糖和酵母 β-葡聚糖换算系数;
- m*——样品质量, 单位为克 (g);
- 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)。

公式 (1) 中:

$$c_S' = \frac{m_S \times P \times V_2}{0.9 \times V_1 \times V_3 \times 100} \dots \dots \dots (2)$$

式中:

- c*_S'——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*_S——酵母 β-葡聚糖对照品的质量, 单位为毫克 (mg);
- P*——酵母 β-葡聚糖对照品的纯度 (依据试剂厂家提供的纯度报告), 单位为克每百克 (g/100g);

- V_2 ——从溶壁酶酶解液中移取的酶解液体积，单位为毫升（mL）；
 0.9——葡萄糖和酵母 β -葡聚糖换算系数；
 V_2 ——溶壁酶酶解后酶解液的体积，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）；
 100——对照品纯度单位转化系数。

当样品与对照品按照 4.4 操作过程，二者的 V_1 、 V_2 、 V_3 完全相同时，公式 1 可简化为：

$$X = \frac{(c - c_0) \times m_s \times P}{(c_s - c_0) \times m \times 100} \dots \dots \dots (3)$$

其中：

- X ——食品中葡聚糖的含量，单位为克每千克（g/kg）；
 c ——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 ——酵母 β -葡聚糖对照品的质量，单位为毫克（mg）；
 P ——酵母 β -葡聚糖对照品的纯度（依据试剂厂家提供的纯度报告），单位为克每百克（g/100g）；
 c_s ——对照品酶解液的葡萄糖含量的测定值，单位为克每升（g/L）；
 m ——样品质量，单位为克（g）；
 100——对照品纯度单位转换系数。

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。

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 %。

8 其他

当称样量为10 g时，方法检出限为0.045 g/kg，定量限为0.15 g/kg。