

《酿酒酵母培养物中甘露聚糖的测定
反相高效液相色谱法》
团体标准

(征求意见稿)

编 制 说 明

中关村量子生物农业产业技术创新战略联盟
二零二叁年八月

一、任务来源于制定背景

1、任务来源

基于“十四五”国家重点研发计划“揭榜挂帅”项目“蛋白饲料生物工程制造前沿技术及新产品创制”中酵母产品创制及产业化应用的任务，北京农学院、北京中农弘科生物技术有限公司、河北弘科荣达生物技术有限公司、安琪酵母股份有限公司、安徽东方新新生物技术有限公司、北京大北农科技集团股份有限公司、中国农业大学、铁骑力士食品有限责任公司共同开展团体标准的编制工作，中关村量子生物农业产业技术创新战略联盟组织行业内专家开展《酿酒酵母培养物中甘露聚糖的测定 反相高效液相色谱法》团体标准的审定工作。

2、标准制定背景

酿酒酵母培养物最早作为进口饲料添加剂进入中国，是以酿酒酵母为菌种，经固体发酵后，浓缩、干燥获得的一种发酵产品，现在已经被广泛应用于反刍、猪、鸡、水产、特种动物及宠物等畜禽养殖领域，截至 2022 年 12 月，公开发表酿酒酵母培养物相关研究 1117 项。

酵母培养物在 2008 年被引入《饲料添加剂品种目录》，2013 年 12 月 19 日，农业部第 2038 号公告将酿酒酵母培养物从《饲料添加剂品种目录》转到《饲料原料目录》，作为单一饲料进行监管和使用，并将蛋白质、粗灰分、水分、甘

甘露聚糖列为该产品的四种强制性指标。

甘露聚糖是酿酒酵母培养物的关键功能因子，能调节动物体液免疫和细胞免疫，平衡肠道菌群，通过结合吸附外源性病原菌、选择性吸附细菌毒素，有效提高动物的抗氧化能力，增强抗病力。因此，甘露聚糖的含量被认为是评价酿酒酵母培养物品质的一项重要指标。

企业传统检测酿酒酵母培养物中甘露聚糖的方法是苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法，但以上两种方法获得的是酿酒酵母培养物中总还原糖含量，不能排除其他糖类对甘露聚糖含量的干扰。同时，上述方法稳定性和专一性较差，测定结果不能准确反应酿酒酵母培养物中甘露聚糖的实际含量。

通过检索分析 1117 项企业标准发现，目前已有 51% 的企业标准采用了高效液相色谱法，说明高效液相色谱法已成为企业测定酿酒酵母培养物中甘露聚糖的主流方法，但由于该方法检测精度与样品前处理密切相关，且仍有部分单糖成分处理不当干扰检测结果，稳定性较差。

截止本标准申请之日，酿酒酵母培养物中甘露聚糖含量的测定暂无国家标准和行业标准，因此迫切需要制定酿酒酵母培养物中甘露聚糖的标准化检测方法，来规范和指导行业健康发展。本次申请团体标准，源自专利检测技术，合理增加样品预处理和水解技术，本标准以反相高效液相色谱法测定酵母培养物中甘露聚糖含量，检测的精准性和稳定性高，

最低检出限可达到 0.1mg/L。本标准作为酿酒酵母培养物的基础性标准，将对规范酿酒酵母培养物产品品质起到重要的引领作用，必将引领酿酒酵母培养物、带动生物饲料产业的发展 and 进步，从而实现健康养殖。

二、主要工作过程

2022 年 12 月，由中关村量子生物农业产业技术创新战略联盟联合北京农学院、北京中农弘科生物技术有限公司和北京大北农科技集团股份有限公司等提出开展《酿酒酵母培养物中甘露聚糖的测定 反相高效液相色谱法》团体标准的编制工作。由北京农学院、北京中农弘科生物技术有限公司、河北弘科荣达生物技术有限公司、安琪酵母股份有限公司、安徽东方新新生物技术有限公司、北京大北农科技集团股份有限公司、中国农业大学、铁骑力士食品有限责任公司共同成立标准起草小组。联盟秘书处协同北京农学院、北京中农弘科生物技术有限公司具体负责标准撰写，并负责承担资料的收集、整理、起草和意见汇总工作。

标准起草小组主要从学术团体普遍公认的文献、标准等进行收集。为确保团体标准结合实际生产，2023 年 1 月初，联盟还特别邀请了生物饲料、动物营养等产业的专家进行沟通交流，确定本标准的主要框架、主体内容等。

2023 年 4 月 26 日，通过标准起草成员前期资料查阅工作的积累以及为标准开展的生产调研活动，在充分了解酵母

培养物产品中甘露聚糖的检测方法的研究现状和生产实践情况的基础上，形成了团体标准的初稿，并组织相关领域专家召开团体标准立项研讨会暨专家讨论会，对本标准提出宝贵意见。会上，专家组肯定了团标的制定意义和内容，建议进一步精准描述，形成具有明确指导性方法，在指导酵母培养物生产企业、饲料企业、养殖企业上可使用本方法对酵母培养物产品进行合理品控，尽快发布。

三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

本标准按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则制定，在编制过程中参照了国家、行业、地方等相关标准，参考了酵母培养物、甘露聚糖和检测方法等领域的相关文献，结合起草单位北京中农弘科生物技术有限公司自有知识产权的国家发明专利技术《一种酵母培养物中甘露聚糖的检测方法》(ZL 2017 1 0219300.2)，并综合考虑我国酵母培养物的研发、生产和应用企业的实际情况，遵循科学性、准确性和实用性的原则，制定团体标准《酿酒酵母培养物中甘露聚糖的测定 反相高效液相色谱法》的技术规范。

1、总体编制原则

甘露聚糖是酵母细胞壁重要活性成分，占细胞壁干重的40%左右，是评价酿酒酵母培养物品质的重要指标。本标准按照甘露聚糖检测方法原理、试验试剂材料、样品预处理、测定步骤及测算公式等方面进行了规范描述。指导发酵饲料

企业和养殖单位科学合理测定酿酒酵母培养物中甘露聚糖含量，该标准与现行法律法规无冲突，并保证了对该标准最新版本的引用。

1.1 科学性

在合适的条件下，甘露聚糖链的 α -1,6-糖苷键连接的骨架可以完全断开，生成甘露糖或其寡糖。因此，酵母甘露聚糖普遍的检测方法是将甘露聚糖充分水解成单糖，测定单糖含量，再经过换算得到甘露聚糖含量，目前，企业常规采用的测定方法有苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法和高效液相色谱法（HPLC）等。

1.1.1 苯酚-硫酸法

苯酚-硫酸法的原理：糖在浓硫酸作用下水解成单糖，脱水生成的糖醛衍生物（糠醛和羟甲基糠醛）能与苯酚缩合成一种橙红色化合物，在 10~100 mg 范围内其颜色深浅与糖含量呈正比，且在 485 nm 波长下有最大吸收峰，故可用比色法在此波长下测定。

苯酚-硫酸法方法简单，灵敏度高，无需大型仪器，实验时基本不受蛋白质存在的影响，并且产生的颜色稳定 160 min 以上，但是其准确性和重现性受实验条件、试验前处理和参数（如显色反应）的影响较大^[1-2]，且测定的是总还原糖的含量，专一性较差。

采用苯酚-硫酸法来特异性检测酵母甘露聚糖含量的研

究报道较多，大多需要针对不同样品对进行优化处理，从而有效地避免干扰。贾瑞波等^[3]通过单因素和正交试验发现，苯酚浓度 3%、硫酸用量 0.5 mL、显色时间 15 min、显色温度 80℃为苯酚-硫酸法测定甘露聚糖肽中甘露聚糖含量的适宜条件，平均回收率为 102.7%，相对标准偏差为 1.4%。张玉香等^[4]通过苯酚-硫酸法测定了饲用酵母甘露聚糖（甘露糖蛋白）的含量，首先通过乙醇沉淀和 Sephadex G-75 层析柱进行提纯，再分别吸取标准溶液和待测溶液于具塞试管中，加入 1.0 mL 6%苯酚和 5.0 mL 浓硫酸，静置 10 min，摇匀后室温放置 20 min，在 490 nm 测定其吸光值，通过标准曲线计算出酵母甘露聚糖成品中多糖含量为 88%，而经过进一步薄层层析分析表明该多糖均为甘露聚糖。由此可知，苯酚-硫酸法前期的提纯处理步骤非常关键，因此，在使用苯酚-硫酸法测定饲用酵母甘露聚糖含量时，增加能够排除样品中其他多糖或单糖干扰的前处理步骤，并优化苯酚浓度、酸处理浓度、反应时间、温度等参数，这对改善苯酚-硫酸法的重复性和稳定性非常关键。

1.1.2 蒽酮-硫酸法

蒽酮-硫酸法的原理：糖在浓硫酸作用下，可经脱水反应生成糠醛和羟甲基糠醛，能与蒽酮反应生成蓝绿色糠醛衍生物，在一定范围内，颜色的深浅与糖的含量呈正比，故可用于糖的测定。

蒽酮-硫酸法针对的检测目标是样品中所有的碳水化合物，包括淀粉、纤维素、寡糖等，即蒽酮-硫酸法测定的是总还原糖，不能区分不同糖类，若使用该法在测定饲用酵母甘露聚糖时，则应注意切勿将未溶解残渣加入到反应液中，否则会由于细胞壁中的葡聚糖、几丁质等与蒽酮发生反应而高估样品中甘露聚糖的含量，与此同时，应建立适宜的前处理步骤，尽量排除其他单糖或多糖的干扰^[5-6]。

1.1.3 反相高效液相色谱法（RP-HPLC）

RP-HPLC 测定饲用酵母甘露聚糖主要分为以下几个步骤：①多糖水解。将酵母甘露聚糖在酸性条件下水解为单糖——甘露糖。②单糖衍生化。水解后获得的甘露糖在碱性条件下能与糖类常用的衍生试剂 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）或对氨基苯甲酸（p-AMBA）发生定量反应^[7]，所生成的衍生物稳定、紫外吸收强^[8]，同时将甘露糖标准溶液在相同条件下进行衍生化反应。③色谱分析和检测。衍生化后的样品和标准品溶液经 HPLC 进行分析检测。④结果计算。根据得到的色谱数据计算样品中甘露糖的质量，再换算成甘露聚糖的含量。

林钦恒等^[9]通过柱前衍生化 HPLC 测定了酵母细胞壁中的甘露聚糖与 β -葡聚糖的含量，结果发现以 0.02 mol/L 乙酸铵-乙腈为流动相等度洗脱，反相 C18 柱分离，250 nm 波长进行检测，甘露糖和葡萄糖在 10.0~1 000 mg/L 范围内与

对应峰面积呈良好的线性关系，相关系数大于 0.999，检出限分别为 0.10 mg/L 和 0.08 mg/L。张相飞等^[10]建立了柱前衍生化 HPLC 测定饲用酵母培养物中甘露聚糖的方法，将酵母培养物经均质处理使酵母细胞充分破壁后，在 72% 硫酸作用下，酵母多糖充分水解得到单糖，单糖用 PMP 衍生化后，再以 0.1 mol/L pH 5.5 乙酸铵缓冲液:乙腈（体积比为 70:30）为流动相洗脱，反相 C18 柱分离，流速 1.0 mL/min，用紫外检测器（波长 250 nm）检测，结果表明，甘露聚糖含量在 1.0~100 mg/L 范围内与对应峰面积呈线性关系，添加回收率达到 96.3%~102.6%，相对标准偏差为 2.5%，最低检出限为 0.11 mg/L。以上结果表明，RP-HPLC 法对饲用酵母甘露聚糖的测定结果比较稳定可靠，且根据出峰时间不同，可同时测定饲用酵母源生物饲料产品中不同多糖（如甘露聚糖和 β -葡聚糖）的含量。

1.1.4 其他检测方法

除了苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法和 RP-HPLC 法，也有其他方法用来测定酵母甘露聚糖的含量。Chlup 等^[11]采用流式细胞仪来测定酵母中的甘露聚糖含量，通过将 6 种不同的啤酒酵母在温控生物反应器中进行机械搅拌，通过流式细胞仪基于粒径、相对粒度和荧光强度对甘露聚糖残基进行定量检测，结果发现，随着酵母浆液的搅拌，甘露聚糖不断从酵母细胞壁中释放出来，其上清液的甘露聚糖浓度和荧光强度不

断增加。这表明流式细胞仪法可作为测定饲用酵母甘露聚糖含量的一种快速和可行的方法。此外，由于甘露聚糖具有免疫原性，因此还可通过免疫法来特异性定量检测酵母甘露聚糖的含量。Ballous^[12] 制备了 3 株酵母菌的免抗血清，均能与 3 株酵母分离出来的甘露聚糖发生抗体交叉反应，且这些交叉反应的免疫化学物质基础是由甘露聚糖独特的侧链模式决定的，利用抗原抗体反应专一性强的特点，可实现饲用酵母甘露聚糖特异性定量测定。因此，如果针对性地开发甘露聚糖免疫检测试剂盒，就能实现甘露聚糖的特异性快速检测，目前国内外尚缺乏相应的检测产品。

综上所述，常规的苯酚-硫酸法和蒽酮-硫酸法测定的是样品中总还原糖的含量，专一性差，在没有必要细致划分各种碳水化合物的情况下，用苯酚-硫酸法或蒽酮-硫酸法可以一次测出总量，但在测定酵母源生物产品中甘露聚糖含量时不能准确排除葡聚糖、几丁质等其他糖类的干扰，测定结果往往偏高，不能精确反映甘露聚糖的实际含量。所以，在测定多糖混合物或含不同多糖的饲用酵母源生物产品中甘露聚糖含量时，建议选择专一性强的反相高效液相色谱法。

1.2 准确性

酵母培养物生产企业主要采用比色法（苯酚-硫酸和蒽酮-硫酸）、高效液相色谱法作为产品中甘露聚糖的检测方法。但是比色法检测的是酿酒酵母培养物中总还原糖含量，并不

完全是甘露聚糖的含量，检测结果比甘露聚糖含量偏高。

RP-HPLC 法是相关行业标准和团体标准中推荐使用的方法，是将酵母培养物进行预处理后酸性水解，水解产物衍生化后经反相高效液相色谱进行分析检测，根据色谱数据计算出甘露聚糖含量（三种检测方法对比数据见表 1）。

表 1.甘露聚糖检测方法对比

主要方法	原 理	注意事项	结果准确性
苯酚-硫酸法 蒽酮-硫酸法 硼酸氯化钠法 水杨酸还原法	糖在浓硫酸作用下水解成单糖，并迅速脱水生成糖醛衍生物（糠醛和羟甲基糠醛），能与苯酚、蒽酮等化合物缩合成有色化合物，在特定范围内其颜色深浅与糖的含量呈正比，在特定波长下有自大吸收峰	需要根据不同样品进行不同预处理，避免杂质干扰	测定值偏高 回收率 94.58-97.55% 相对标准差 1.82% 最低检出限 0.1g/L
液相色谱法 （酵母细胞壁 行业标准）	根据葡萄糖和甘露糖在流动相、液相色谱柱的固定项之间具有不同的分配系数，将水解后的试样注入液相色谱，用稀硫酸做流动相，糖类分子流出后，经示差检测器检测，用外标法定量	检测酿酒酵母细胞壁等纯度较高的产品中甘露聚糖效果较为准确	灵敏度较低 回收率 90.3-15.6% 相对标准偏差 8.5% 最低检出限 1.0 mg/L
反相 高效液相 色谱法	将酵母培养物进行预处理后再进行酸性水解，水解产物调至中性后进行衍生化反应，将衍生化后的样品溶液和标准品溶液经反相高效液相色谱进行分析检测，根据得到的色谱数据计算出甘露糖的质量，再换算成甘露聚糖的含量	根据不同产品选择酸碱预处理；PMP 衍生温度 70℃、30min 较好	回收率 96.3-102.6% 相对标准偏差 2.5% 最低检出限 0.11mg/L

截止 2023 年 4 月，企业标准信息公共服务平台上 136 个应用高效液相色谱法检测甘露聚糖的企业标准中，引自《饲料原料 酵母细胞壁》（NY/ T 3477-2019）16 个，引自《饲料原料 酿酒酵母培养物》（T/CSWSL 003-2018）20 个，

选采用高效液相色谱和专利技术《一种酵母培养物中甘露聚糖的检测方法》的 100 个。经过不完全比较，选用高效液相色谱法可以比较精准的检测出酵母培养物中甘露聚糖的含量，精确度在十万到百万分之一（1.0-0.11mg/L）。

表 2.本标准中与酵母培养物团标中的甘露聚糖检测方法准确性比较

	团标方法		本标准方法	
预处理技术	-	均质预处理	超声预处理	酶解预处理
水解溶剂	硫酸	硫酸	硫酸	盐酸
含量	0.77%	0.80%	0.86%	0.85%
回收率	94.3~101.1%	96.3-102.6%	96.6-101.9%	95.6-102.1%
标准差	6.5%	2.5%	2.0%	3.0%
检出限	0.12mg/L	0.11mg/L	0.12mg/L	0.10mg/L

本标准中采用的反相高效液相色谱法，完善了预处理技术，并且考虑到了甘露糖在甘露聚糖中残基分子量与水解后得到的甘露糖分子对检测结果带来的影响，在检测过程中增加了甘露糖衍生、检测步骤，在计算过程中补充了样品酸水解过程中甘露糖被破坏造成结果偏低的补偿系数 F 值，这样检测结果更为精准。经过检测比较（表 2），本标准方法回收率 95.6-102.6%，标准差 2.0-3.0%，比现有酵母培养物团体标准中的 HPLC 方法标准差更低，准确度更高。

综上，选用采用本标准中的反相高效液相色谱法，更能精确检测出酵母培养物产品中甘露聚糖的含量，更有利于产品品质监控。

1.3 应用性

通过检索发现，在酵母培养物的 4 项强制指标中，甘露

聚糖是唯一没有相关国家、行业及地方检测标准的重要指标，仅在酵母细胞壁行业标准（NY/ T 3477-2019）和酿酒酵母培养物团体标准（T/CSWSL003-2018）中，使用高效液相色谱法检测该指标。

截止 2023 年 4 月，企业标准信息公共服务平台上检索到现行有效的酿酒酵母培养物企业标准 265 项，其中 225 项企标（85%）把甘露聚糖作为监测指标之一。在这 225 项企业标准中，甘露聚糖的检测方法分别是比色法 79 个（30%），高效液相色谱法 136 个（51%）、其他方法 10 个（沉淀法、试剂盒法，4%）。

所以，在相关行业、团体标准中涉及到酵母甘露聚糖的检测方法，采用了高效液相色谱法；在相关企业标准中，51% 企业选择用高效液相色谱法。所以，选择和推广本标准中反相高效液相色谱法作为检测酵母培养物中甘露聚糖的指导方法，具有广泛的应用性。

1.4 结论

综上所述，本团标反相高效液相色谱检测方法比传统比色法具有高速、高效、高灵敏度、适用范围广、专一性强、样品量少、容易回收等特点；与其他 HPLC 方法比较检测结果更准确；且大部分酵母培养物生产企业、研究机构等具备 HPLC 检测条件。所以本团标方法具备科学性、准确性和应用性。

本标准与现行法律法规无冲突，并保证了对该标准最新版本的引用。

2、主要技术内容的确定

(1) 适用范围

按照 GB/T1.1-2020 标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则中 8.5 “范围这一要素用来界定文件的标准化对象和所覆盖的各个方面”的有关规定，将标准的适用范围确定为“酿酒酵母培养物中甘露聚糖的测定 反相高效液相色谱法”。

(2) 规范性引用文件

本标准制定时，引用了 GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》和 T/CSWSL 003-2018《饲料原料 酿酒酵母培养物》等 1 项国家标准、1 项团体标准。

(3) 术语与定义

对团标涉及的关键术语“甘露聚糖”和“反相高效液相色谱法”进行定义。

(4) 测定方法

本标准规定了试剂、仪器、标准溶液和检测流程等选择范围和测定要求。

根据不同实验室条件，推荐了超声波、酶解和均质三种样品预处理方法，推荐了盐酸水解和硫酸水解两种水解方法，并建议使用甘露糖和甘露聚糖标准品的检测比较获得样品

酸水解过程中甘露糖被破坏造成结果偏低的补偿系数，使检测结果更为精准。

四、采用的国际标准

无。

五、与现行法律法规和强制性标准的关系

本标准是针对《饲料原料目录》中酵母培养物产品的强制性指标——甘露聚糖的指导性方法。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

七、贯彻标准的要求和措施建议

组织学习标准，加大对标准的宣传和贯彻力度，标准委员会作为企业之间的桥梁，做好沟通，推进行业的进一步发展。

八、废止现行有关标准的建议

无。

九、其他应予说明的事项

本标准方法虽然与现行团体标准《酿酒酵母培养物》（T/CSWSL003-2018）中的方法类似，但是在具体方法指导上，首先本标准推荐了根据实验室条件可选择的三种预处理方式，且预处理可以更好的释放出产品中酵母甘露聚糖成分；其次，本标准提出通过甘露糖和甘露聚糖标准品检测获得补偿系数，用以在计算结果时弥补因酸水解造成的甘露聚糖损

失。所以本标准推荐的检测方法更适合相关机构、企业在对酵母培养物科研、生产和应用上的甘露聚糖这一指标的检测。

参考文献:

- [1] Zhang H F, Niu L L, Yang X H, *et al.* Analysis of water- soluble polysaccharides in an edible and medicinal plant Epimedium: method development, validation and application[J]. J AOAC Int, 2014, 97: 784-790.
- [2] 巴媛媛, 王莹, 朴美子. 苯酚 - 硫酸法测定瓦尼木层孔菌菌丝体多糖含量的条件优化 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 389-391
- [3] 贾瑞波, 鹿麟, 韩春辉, 等. 苯酚 - 硫酸法测定甘露聚糖肽口服液中多糖含量的条件优化 [J]. 中国药品标准, 2015, 16(4):271-275.
- [4] 张玉香, 尹卓容. 甘露糖蛋白的提纯及分子量测定 [J]. 酿酒科技, 2005(4): 72-74.
- [5] 张媛媛, 张彬. 苯酚 - 硫酸法与蒽酮 - 硫酸法测定绿茶茶多糖的比较研究 [J]. 食品科学, 2016, 37(4): 158-163.
- [6] 郑旭伟, 黄占波, 楚冬海, 等. 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定托盘根东堂含量的比较 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(23): 119-121.
- [7] 周德庆. 微生物学教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 47-49.
- [8] 张维冰, 王智聪, 张凌怡, 等. 柱前衍生超高效液相色谱 - 串联四极杆质谱法测定仙草多糖组成及其含量 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(2): 143-149.
- [9] 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.
- [10] 张相飞, 刘明, 李文辉. 柱前衍生高效液相色谱法测定酵母培养物中甘露聚糖的含量 [J]. 饲料工业, 2017, 38(16): 60- 62.
- [11] Chlup P H, Conery J, Stewart G G. Detection of mannan from *Saccharomyces cerevisiae* by flow cytometry[J]. J Am Soc Brew Chem, 2007, 65: 151-156.
- [12] Ballou C E. A Study of the immunochemistry of three yeast mannans[J]. J Biol Chem, 1970, 245: 1193-1203.