

中华人民共和国国家标准

GB/T 5521—2008
代替 GB/T 5521—1989

粮油检验 谷物及其制品中 α -淀粉酶 活性的测定 比色法

Inspection of grain and oils—Determination of alpha-amylase
activity in cereal and cereal products—Colorimetric method

HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

2008-11-04 发布

2009-01-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准是对 GB/T 5521—1989《谷物和谷物产品 α -淀粉酶活性的测定 比色法》的修订。

本标准代替 GB/T 5521—1989。

本标准与 GB/T 5521—1989 相比主要变化如下：

- 增加了规范性引用文件；
- 对术语和定义进行了修改；
- 增加了对测试报告的要求；
- 将计算举例由正文调至附录，作为资料性附录。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由国家粮食局提出。

本标准由全国粮油标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：南京财经大学。

本标准主要起草人：鞠兴荣、王素雅、袁建、杨慧萍。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 5521—1985、GB/T 5521—1989。

MACY 美析仪器
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

粮油检验 谷物及其制品中 α -淀粉酶活性的测定 比色法

1 范围

本标准规定了比色法测定谷物及制品中 α -淀粉酶活性的术语和定义、原理、试剂和材料、仪器、操作步骤、结果计算、精密度和测试报告。

本标准适用于测定谷物和谷物产品 α -淀粉酶活性,也可用于测定源于真菌和细菌的 α -淀粉酶干粉的活性。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 术语和定义

下列术语与定义适用于本标准。

3.1

β -极限糊精 β -limit dextrins

能被 β -淀粉酶完全降解的淀粉产物。

3.2

酶活力单位 enzymic activity

1 L 溶剂从 1 g 样品中所提取的酶,在规定条件下,每秒钟降解 1.024×10^{-5} 单位的 β -极限糊精底物溶液,该样品的 α -淀粉酶活力为 1 个单位。

4 原理

α -淀粉酶降解 β -极限糊精底物溶液,在酶促反应进程中,分别在不同时间将反应混合物等分加到碘溶液中。随着反应时间的延长,反应混合物与碘液的显色强度降低,以测定酶活性。

5 试剂和材料

除非另有说明,所用试剂均为分析纯。实验用水符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

- 5.1 碘。
- 5.2 碘化钾。
- 5.3 氯化钙。
- 5.4 无水乙酸钠。
- 5.5 硫酸。
- 5.6 冰乙酸。
- 5.7 可溶性淀粉。

注:可采用 Lintner 淀粉或质量相当的国产可溶性淀粉。

5.8 浮石粉。

5.9 碘贮备液:称取 11.0 g 碘化钾溶于少量水中,加 5.50 g 结晶碘,搅拌至碘完全溶解。再定容至 250 mL,置于棕色瓶中,在暗处贮存,此溶液可保存一个月。

5.10 碘稀释液:称取 40.0 g 碘化钾溶于水中,加 4.00 mL 碘贮备液,并稀释至 1 L,用时现配,不可过夜。

5.11 硫酸溶液: $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0.05 \text{ mol/L}$ 。

5.12 缓冲液:称取 164 g 无水乙酸钠溶于水中,加入 120 mL 冰乙酸,用水定容至 1 L。

5.13 氯化钙溶液: $c(\text{CaCl}_2) = 0.2\%$ 。

5.14 β -淀粉酶溶液:称取 10 g 有酶活性的黄豆粉(粗细度为通过 1.5 mm 孔筛),加入 85 mL 水和 15 mL 0.05 mol/L 硫酸(5.11)充分搅匀,静置 15 min,抽滤,该滤液即为 β -淀粉酶溶液。

5.15 β -极限糊精溶液:称取 5.00 g(干基)可溶性淀粉于小烧杯中,加入约 20 mL 水混匀,将其边搅拌边缓慢倒入盛有 100 mL 沸水的 500 mL 高型烧杯(6.6)中,并用洗瓶将小烧杯中的淀粉全部转移至高型烧杯中,继续搅拌并加热,缓慢煮沸 2 min。加盖表面皿,在自来水中冷却至 30 °C 以下,加入 25 mL 缓冲溶液(5.12)及 50 mL β -淀粉酶溶液(5.14),在室温下放置 20 h,加入 1 勺浮石粉,将此溶液在 10 min 之内缓慢煮沸,然后继续沸腾 5 min 以上。冷却至 30 °C 以下,用水定容至 250 mL,摇匀,过滤。滤液中加几滴甲苯,此溶液的 pH 值应为(4.7±0.1),在 25 °C 以下可连续使用 5 天。

6 仪器

6.1 恒温水浴:30 °C±0.1 °C 与 20 °C±0.1 °C 各 1 台。

6.2 分光光度计或比色计。

6.3 秒表。

6.4 筛:孔径为 1.0 mm、1.5 mm。

6.5 pH 计。

6.6 烧杯及高型烧杯:100 mL、250 mL、500 mL。

6.7 容量瓶:250 mL、1 000 mL。

6.8 锥形瓶:300 mL。

6.9 移液管:5 mL、20 mL。

6.10 分析天平:分度值 0.01 g。

7 操作步骤

7.1 分光光度计及其空白调整

将分光光度计(6.2)连接稳压电源,预热 20 min,调整波长为 575 nm。将 2.0 mL 氯化钙溶液(5.13)加到 10.0 mL 碘稀释液(5.10)中,然后以适量的水(V_0)稀释(加水量一般为 20 mL~40 mL, V_0 详见 7.2),混匀后置于 20 °C 水浴中,用 1 cm 比色皿进行测试,调节仪器狭缝宽度,使吸光度为零。

7.2 底物溶液的校准

分别吸取 5.0 mL β -极限糊精溶液(5.15)和 15.0 mL 氯化钙溶液(5.13)于一个 100 mL 烧杯(6.6)中,混匀。取出 2.0 mL 混合液至另一个 100 mL 烧杯(6.6)中,加入 10.0 mL 碘稀释液(5.10)和适量的水,混匀后置于 20 °C 水浴中,用 1 cm 比色皿在波长 575 nm 处,以 7.1 所用溶液为参比,测其吸光度。调整加水量,使测得的吸光度在 0.55~0.60 之间,如果测得吸光度大于 0.60 则增大加水量,如果测得值少于 0.55 则减少加水量。通过反复试配,直至测定的吸光度值在 0.55~0.60 之间,记下此时的加水量(V_0),并用它调整空白溶液的加水量, V_0 即为该 β -极限糊精测试时的加水量。

7.3 提取

称取谷物样品约 5 g(精确到 0.05 g),倒入 300 mL 锥形瓶中,加入预热到 30 °C 的氯化钙溶液

(5.13)100 mL±0.5 mL,充分摇匀,置于30℃的恒温水浴中。在15 min、30 min、45 min时从水浴中取出,上下颠倒锥形瓶(6.8)10次,重新置于水浴,共提取60 min。取出锥形瓶并过滤,滤液即为α-淀粉酶的提取液。

7.4 活性测定

将α-淀粉酶提取液和β-极限糊精溶液置于30℃水浴中预热,10 min后用快速移液管吸移5.0 mL β-极限糊精溶液(5.15)至盛有15.0 mL酶提取液(7.3)的锥形瓶中,加塞后摇匀。在加液的同时,用秒表计时。吸取10.0 mL稀碘溶液(5.10)于各个50 mL容量瓶(6.7)中,加入V₀ mL水(7.2),混匀加塞后置于20℃水浴中,每隔5 min或10 min进行下列操作:

- 吸取2.0 mL酶、β-极限糊精混合液(7.4)到一个盛有稀碘溶液和V₀ mL水的容量瓶中,摇匀后置于20℃水浴中,使混合溶液温度达到20℃;
- 倒入比色皿测其吸光度。

8 结果计算

试样的α-淀粉酶活性按式(1)计算:

$$A = \frac{500 \times f}{m} \times \frac{100}{100 - h} \times \frac{\lg D_1 - \lg D_2}{t_1 - t_2} = \frac{500 \times f \times b}{m} \times \frac{100}{100 - h} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A——α-淀粉酶活性,以U(单位)计;

m——100 mL氯化钙提取的试样质量,单位为克(g);

h——试样中水分含量(以质量分数计),%;

f——酶提取液的稀释倍数;

t₁、t₂——不同的反应时间,单位为分(min);

D₁、D₂——时间t₁、t₂时的吸光度;

b——lgD对t曲线的斜率的绝对值;

500——系数。

9 精密度

同一样试样,在同一实验室同时或连续两次测定结果之差,不得超过平均值的10%,如果两次测定结果符合要求,则取结果的平均值。按表1修约:

表1 结果表示方式

活性/U(单位)	修约成整数范围/U(单位)
<50	0.1
50~500	1
500~5 000	10
5 000~50 000	100

注1:测定过程中应合理调整酶的浓度,使35%~60%的β-极限糊精在15 min内降解,即最后测得的吸光度为底物校准时吸光度的40%~65%。如果吸光度降得太快,则酶液可用0.2%的氯化钙溶液再稀释。如酶的活性太低,为获得正确结果,可将反应时间延长到60 min以上。

注2:用分光光度计测定吸光度时,溶液温度对结果有影响,必须控温在20℃。在7.4的操作中,从显色到测定吸光度的间隔时间一般对结果没有影响,如测定一系列样品,可在所有样品均完成显色后再一起测定吸光度。但最长间隔时间不得超过1 h。

10 测试报告

测试报告应详细说明:

- 包括鉴定样品所必需的全部信息；
- 若已知采样方法，则注明；
- 本标准中没有具体说明的、或者被认为是可选的，以及所有可能影响实验结果的操作细节；
- 所得的测定结果；
- 如进行了重复性试验，列出结果。



附 录 A
(资料性附录)
计 算 举 例

含 14.2% 水分的样品 5.20 g, 用 100 mL 氯化钙溶液(5.13)提取。由于酶提取液与极限糊精的反应速度太快, 故用氯化钙溶液稀释酶提取液, 1 份酶提取液(7.3)加 1.5 份氯化钙溶液(5.13)。因此 $f=1+1.5=2.5$ 。 β 极限糊精与酶提取液混合后, 间隔 5 min、10 min 和 20 min 后, 吸光度分别如表 A.1 所示:

表 A.1 不同反应时间后的吸光度

时间/min	吸光度 D	$\lg D+1$
5	0.498	0.697
10	0.425	0.628
20	0.308	0.489

根据 5 min 和 10 min 后的观察结果:

$$b = \frac{0.697 - 0.628}{10 - 5} = 0.0138 \text{ min}^{-1}$$

把 $b=0.0138$ 代入式(1)得:

$$A = \frac{500 \times 2.5 \times 0.0138}{5.20} \times \frac{100}{100 - 14.2} = 3.9 \text{ U}$$

如用三个观察结果作 $\lg D+1$ 对 t 的曲线(见图 A.1), 得 $b=0.0139$ 。

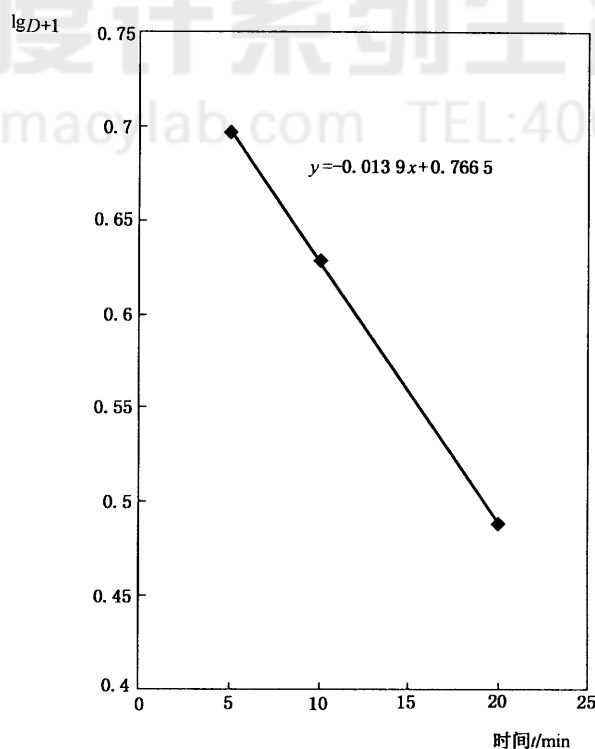


图 A.1

参 考 文 献

- [1] ISO 3983:1977 Method for determination of alpha-amylase activity in cereal and cereal products—Colorimetric method.
- [2] GB/T 5521—1989 谷物和谷物产品 α -淀粉酶活性的测定 比色法.
- [3] GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法.
- [4] GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备.
- [5] GB/T 1.1—2000 标准化工作导则 第1部分:标准的结构和编写规则.
- [6] GB/T 20001.4—2001 标准编写规则 第4部分:化学分析方法.
- [7] ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1: General principles and definitions.
- [8] ISO 5725-2:1994 Accuracy(trueness and precision)of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.

 美析仪器
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

M **MACY** **美析仪器**
MACY INSTRUMENT

专业光度计系列生产厂家
中华人民共和国
国家标准

粮油检验 谷物及其制品中 α -淀粉酶
活性的测定 比色法

HTTP://www.macylab.com TEL: 010-68523946

GB/T 5521—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

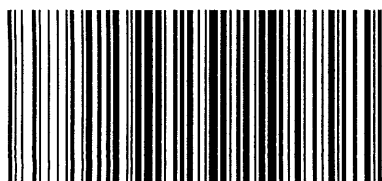
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字
2009年1月第一版 2009年1月第一次印刷

*

书号: 155066·1-35466 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 5521-2008