

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13278:2021

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ
CELLULASE CÓ KHẢ NĂNG ĐƯỜNG HOÁ
BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦY PHÂN GIẤY LỌC**

*Foodstuffs – Determination of saccharifying cellulase activity
by filter paper assay*

HÀ NỘI – 2021

Lời nói đầu

TCVN 13278:2021 được xây dựng trên cơ sở tham khảo tài liệu của Liên đoàn quốc tế về Hoá học thuần túy và Hoá học ứng dụng (IUPAC) *Measurement of cellulase activities. Guidelines and determines enzyme activity as filter paper units in a cellulase preparation;*

TCVN 13278:2021 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm – Xác định hoạt độ cellulase có khả năng đường hóa bằng phương pháp thủy phân giấy lọc

Foodstuffs – Determination of saccharifying cellulase activity by filter paper assay

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp thủy phân giấy lọc để xác định hoạt độ cellulase có khả năng đường hóa trong thực phẩm.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

2.1

Đơn vị hoạt độ cellulase đường hoá (filter paper unit)

FPU

Lượng cellulase xúc tác cần thiết để giải phóng 1 μmol glucose từ 50 mg giấy lọc trong thời gian 1 min ở 50 °C.

3 Nguyên tắc

Dùng cellulase trong mẫu thử để thủy phân cơ chất cellulose dưới dạng giấy lọc thành glucose. Lượng glucose tạo thành được xác định dựa trên đường chuẩn tuyến tính giữa nồng độ glucose và độ hấp thụ quang ở 540 nm, từ đó xác định hoạt độ cellulase.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước sử dụng phải là nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

4.1 Dung dịch natri hydroxit, 0,1 N

4.2 Dung dịch axit clohydric, 0,1 N

TCVN 13278:2021

4.3 Giấy lọc, loại Whatman Số 1 (kích thước 1,0 cm x 6,0 cm) (khoảng 50 mg)

Giấy lọc được cắt vụn để sử dụng làm cơ chất cho phản ứng.

4.4 Thuốc thử DNS

Hòa tan 10,6 g axit 3,5-dinitrosalicylic và 19,8 g natri hydroxit vào 1416 mL nước cất. Thêm 306 g natri kali tartarat, 7,6 mL phenol và 8,3 g natri metabisulfit và hòa tan.

Chuẩn độ 3 mL thuốc thử bằng dung dịch axit clohydric 0,1 N (4.2), sử dụng chỉ thị phenolphthalein để nhận biết điểm kết thúc. Thể tích dung dịch axit clohydric chuẩn độ cần trong khoảng từ 5 mL đến 6 mL. Thêm natri hydroxit nếu cần (2 g tương đương 1 mL axit clohydric 0,1 N).

4.5 Dung dịch đệm xitrat, 1 M, pH 4,3

Hòa tan 210 g axit xitric ngâm một phần tử nước vào 750 mL nước, thêm từ từ natri hydroxit cho đến khi pH cân bằng 4,3. Lượng natri hydroxit sử dụng để điều chỉnh pH trong khoảng 50 g đến 60 g. Định mức bằng nước đến 1 L.

4.6 Dung dịch đệm xitrat, 0,05 M, pH 4,8

Hút 50 mL dung dịch đệm xitrat 1 M, pH 4,3 (4.5) vào 900 mL nước, chỉnh pH đến 4,8 bằng dung dịch natri hydroxit 0,1 N (4.1). Chuyển vào bình định mức 1 L (5.10) và pha loãng bằng nước đến vạch.

4.7 Dung dịch chuẩn glucose

4.7.1 Dung dịch chuẩn gốc glucose, 10 mg/mL

Dùng cân (5.1), cân 1,0 g glucose khan chính xác đến 0,1 mg cho vào bình định mức 100 mL (5.10). Hoà tan bằng nước sau đó định mức đến vạch, lắc đều.

Tính nồng độ chính xác của dung dịch dựa trên khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chất chuẩn.

4.7.2 Dung dịch chuẩn làm việc glucose

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn làm việc glucose từ dung dịch chuẩn gốc (4.7.1) như sau:

Dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 6,7 mg/mL: hút chính xác 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc glucose (4.7.1) và 0,5 mL dung dịch đệm xitrat (4.6).

Dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 5,0 mg/mL: hút chính xác 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc glucose (4.7.1) và 1,0 mL dung dịch đệm xitrat (4.6).

Dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 3,3 mg/mL: hút chính xác 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc glucose (4.7.1) và 2,0 mL dung dịch đệm xitrat (4.6).

Dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 2,0 mg/mL: hút chính xác 1,0 mL dung dịch chuẩn gốc glucose (4.7.1) và 4,0 mL dung dịch đệm xitrat (4.6).

5 Thiết bị, dụng cụ

- 5.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg
- 5.2 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 5.3 Máy đo pH.
- 5.4 Đồng hồ bấm giờ
- 5.5 Nồi cách thủy đun sôi
- 5.6 Máy đo quang phổ, có thể đo ở bước sóng 540 nm
- 5.7 Pipet tự động
- 5.8 Ống nghiệm thủy tinh, kích thước 13 x 100 mm
- 5.9 Bể nước đá
- 5.10 Bình định mức, dung tích 100 mL và 1 L

6 Lấy mẫu

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Tham khảo các tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm. Trong trường hợp chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm, việc lấy mẫu theo thỏa thuận giữa các bên liên quan.

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

7 Cách tiến hành

CHÚ THÍCH: Tham khảo Phụ lục A về phương pháp xác định hoạt độ cellulase có nguồn gốc từ *Trichoderma reesei*.

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Dùng cân (5.1), cân 1,0 g mẫu thử chính xác đến 0,1 mg, sau đó hòa tan và pha loãng mẫu thử trong dung dịch đệm xitrat 0,05 M, pH 4,8 (4.6), sao cho lượng enzym trong dịch pha loãng giải phóng lượng glucose dao động nhỏ quanh mức 2,0 mg (khoảng từ 1,9 mg đến 2,1 mg).

7.2 Xác định hoạt độ cellulase

LƯU Ý: Mỗi phép thử xác định hoạt độ cellulase được thực hiện lặp lại hai lần đối với các loại ống nghiệm (ống nghiệm chứa mẫu thử, ống nghiệm chứa mẫu trắng và mẫu kiểm soát, ống nghiệm chứa mẫu chuẩn glucose).

TCVN 13278:2021

7.2.1 Mẫu giấy lọc

Cân khoảng 50 mg giấy lọc (4.3) đã cắt nhỏ vào các ống nghiệm (5.8). Thêm 1,0 mL dung dịch đệm xitrat 0,05 M, pH 4,8 (4.6) vào ống, phần giấy lọc phải được thấm đều dung dịch đệm. Ổn định nhiệt độ đến 50 °C trên nồi cách thủy (5.2) trong 5 min. Thêm 0,5 mL mẫu thử đã được pha loãng (7.1). Cần chuẩn bị ít nhất hai độ pha loãng khác nhau cho mỗi mẫu thử, một độ pha loãng giải phóng nhiều hơn 2,0 mg glucose và một độ pha loãng giải phóng ít hơn 2,0 mg glucose. Hàm lượng glucose được giải phóng nằm trong khoảng 1,9 đến 2,1 mg glucose. Ủ ở 50 °C trên nồi cách thủy (5.2) trong chính xác 60 min. Lấy các ống ra khỏi nồi cách thủy (5.2), dừng phản ứng của enzym bằng cách thêm 3,0 mL thuốc thử DNS (4.4), trộn đều.

7.2.2 Mẫu trắng và mẫu kiểm soát

7.2.2.1 Mẫu trắng

Cho 1,5 mL dung dịch đệm xitrat 0,05 M, pH 4,8 (4.6) vào ống nghiệm (5.8). Ủ ống nghiệm ở 50 °C trên nồi cách thủy (5.2) cùng với mẫu thử trong chính xác 60 min. Thêm 3,0 mL thuốc thử DNS (4.4) và trộn đều.

7.2.2.2 Mẫu kiểm soát enzym

Cho 1,0 mL dung dịch đệm xitrat 0,05 M, pH 4,8 (4.6) và 0,5 mL dung dịch enzym pha loãng (7.1) vào ống nghiệm (5.8). Ủ ống nghiệm ở 50 °C trên nồi cách thủy (5.2) cùng với mẫu thử trong chính xác 60 min. Thêm 3,0 mL thuốc thử DNS (4.4) và trộn đều.

7.2.2.3 Mẫu kiểm soát cơ chất

Cho 1,5 mL dung dịch đệm xitrat 0,05 M, pH 4,8 (4.6) và khoảng 50 mg giấy lọc đã cắt nhỏ vào ống nghiệm (5.8). Ủ ống nghiệm ở 50 °C trên nồi cách thủy (5.2) cùng với mẫu thử trong chính xác 60 min. Thêm 3,0 mL thuốc thử DNS (4.4), trộn đều.

7.2.3 Mẫu chuẩn glucose

Cho 1,0 mL đệm xitrat 0,05 M, pH 4,8 (4.6) và 0,5 mL dung dịch chuẩn glucose vào ống nghiệm (5.8). Ủ ống nghiệm ở 50 °C trên nồi cách thủy (5.2) cùng với mẫu thử trong chính xác 60 min. Thêm 3,0 mL thuốc thử DNS (4.4) và trộn đều.

7.2.4 Tạo màu

Đun sôi tất cả các ống nghiệm trong chính xác 5 min trong nồi cách thủy đun sôi (5.5). Tất cả các mẫu thử, mẫu trắng, mẫu kiểm soát và mẫu chuẩn glucose cần được gia nhiệt cùng lúc. Sau đó, chuyển sang bể nước đá (5.10). Để nguội các ống nghiệm cho đến khi bột giấy lắng xuống hoàn toàn hoặc ly tâm nhanh. Pha loãng tất cả các ống nghiệm với nước (0,2 mL hỗn hợp phản ứng tạo màu với 2,5 mL nước cất và trộn đều). Đo độ hấp thụ quang so với mẫu trắng ở bước sóng 540 nm.

7.2.5 Dụng đường chuẩn

Dụng đường chuẩn glucose tuyến tính giữa lượng glucose (mg/0,5 mL) với độ hấp thụ quang A tương ứng ở bước sóng 540nm. Độ hấp thụ của các dung dịch chuẩn glucose đã pha nằm trong khoảng 0,1 đến 1,0.

Sử dụng đường chuẩn này, chuyển đổi các giá trị độ hấp thụ của ống mẫu thử (sau khi đã trừ mẫu trắng) thành lượng glucose giải phóng. Tính nồng độ enzym giải phóng chính xác 2,0 mg glucose bằng cách chuyển đổi lượng glucose giải phóng sang logarit của nồng độ enzym dựa trên biểu đồ giấy semilogarit. Nối hai điểm nồng độ enzym giải phóng lượng glucose gần 2,0 mg, dựa trên biểu đồ nội suy ra nồng độ enzym giải phóng chính xác 2,0 mg glucose.

8 Tính kết quả

Hoạt độ cellulase trong mẫu thử, X , biểu thị bằng đơn vị hoạt độ trên gam (FPU/g), được tính theo công thức:

$$X = \frac{0,37 \times V \times D}{C \times w}$$

Trong đó:

0,37 là hệ số chuyển đổi từ 2,0 mg glucose sang 1 μ mol glucose;

V là thể tích định mức của mẫu thử, tính bằng mililit (mL);

D là hệ số pha loãng của mẫu thử;

C là nồng độ enzym thích hợp giải phóng 2,0 mg glucose, tính bằng g/mL;

W là khối lượng của mẫu thử, tính bằng gam (g).

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Xác định hoạt độ cellulase có nguồn gốc *Trichoderma reesei* bằng phương pháp FPU

A.1 Chuẩn bị dung dịch thử

Tất cả các mẫu thử enzym được pha loãng với độ pha loãng khác nhau bằng dung dịch đệm xitrat (4.6). Dung dịch enzym gốc được pha loãng với tỉ lệ 1 : 20 bằng dung dịch đệm xitrat (4.6).

Số thứ tự	Thể tích dung dịch đệm xitrat (4.5), mL	Thể tích enzym 1 : 20, mL	Nồng độ, g/mL
1	1650	350	0,00875
2	1700	300	0,00750
3	1800	200	0,00500
4	1850	150	0,00375
5	1900	100	0,00250

Nồng độ enzym được xác định là tỷ lệ giữa lượng dung dịch enzym gốc trên lượng pha loãng thêm vào hỗn hợp phản ứng. Ví dụ, với độ pha loãng 1 : 10 của dung dịch enzym gốc 1 : 20, nồng độ là 0,005.

A.2 Dựng đường chuẩn

Pha loãng dung dịch chuẩn glucose theo Bảng A.1 và đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch. Dựng đường chuẩn của độ hấp thụ theo nồng độ glucose.

Bảng A.1 – Pha loãng dung dịch chuẩn glucose

Thể tích dung dịch chuẩn gốc glucose (4.7.1), mL	Thể tích dung dịch đệm xitrat (4.6), mL	Độ pha loãng	Nồng độ dung dịch chuẩn làm việc glucose	Ví dụ về độ hấp thụ đo được ở 540 nm
1,0	0,5	1 : 1,5	3,35 mg/0,5 mL	0,765
1,0	1,0	1 : 2	2,50 mg/0,5 mL	0,579
1,0	2,0	1 : 3	1,65 mg/0,5 mL	0,384
1,0	4,0	1 : 5	1,00 mg/0,5 mL	0,220

A.3 Xác định hàm lượng glucose có trong mẫu thử

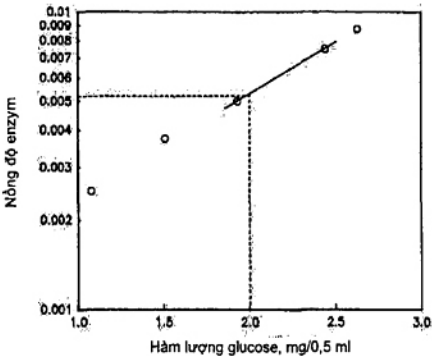
Đo độ hấp thụ của dung dịch thử. Hàm lượng glucose có trong mẫu thử được xác định dựa vào đường chuẩn (xem A.2).

Bảng A.2 – Xác định hàm lượng glucose có trong mẫu thử

Số thứ tự	Ví dụ về độ hấp thụ của dung dịch thử đo được ở 540 nm	Hàm lượng glucose, mg/0,5 mL
1	0,603	2,63
2	0,567	2,44
3	0,442	1,93
4	0,346	1,51
5	0,248	1,08

A.4 Xác định nồng độ enzym

Xác định nồng độ enzym giải phóng chính xác 2,0 mg glucose dựa trên đồ thị giữa lượng glucose giải phóng và nồng độ enzym.



Hình A.1 – Ví dụ về đồ thị xác định nồng độ enzym theo hàm lượng glucose trong dung dịch thử

TCVN 13278:2021

A.5 Xác định hoạt độ enzym

Tính đơn vị hoạt độ enzym của mẫu thử, X , như sau:

$$X = \frac{0,37}{0,053} = 70 \text{ (FPU/mL)}$$
