

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13286:2021

Xuất bản lần 1

**CHẾ PHẨM ENZYM – XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ
GLUCOAMYLASE BẰNG PHƯƠNG PHÁP
QUANG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ**

*Enzyme preparations – Determination of glucoamylase activity
by spectrophotometric method*

HÀ NỘI – 2021

Lời nói đầu

TCVN 13286:2021 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 994.09 *Glucoamylase activity in industrial enzyme preparations. Colometric enzymatic method*;

TCVN 13286:2021 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.

Chế phẩm enzym – Xác định hoạt độ glucoamylase bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử

Enzyme preparations – Determination of glucoamylase activity by spectrophotometric method

CẢNH BÁO: Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hoạt độ glucoamylase trong chế phẩm enzym công nghiệp bằng quang phổ hấp thụ phân tử.

Giới hạn định lượng của phương pháp là 0,1 U/g.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Đơn vị hoạt độ glucoamylase (unit of glucoamylase activity)

U

Lượng glucoamylase xúc tác để giải phóng 0,1 μ mol p-nitrophenol (PNP) trong thời gian 1 min từ cơ chất p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) ở nhiệt độ 50 °C, pH 4,3.

3 Nguyên tắc

Thuốc thử PNPG được enzym glucoamylase thủy phân ở nhiệt độ 50 °C, pH 4,3 thành PNP và glucose. Định lượng PNP được giải phóng trên mỗi đơn vị thời gian dựa vào PNP chuẩn, giá trị này được sử dụng để tính hoạt độ của enzym.

4 Thuốc thử

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

4.1 Dung dịch natri cacbonat, 0,3 M

Hòa tan 15,9 g natri cacbonat (Na_2CO_3) vào nước, thêm nước đến 500 mL.

4.2 Dung dịch đệm axetat, 0,1 M

Hòa tan 4,4 g natri axetat trihydrat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) vào khoảng 800 mL nước, thêm 4,5 mL axit axetic băng. Chỉnh đến pH $4,5 \pm 0,05$ (sử dụng natri axetat hoặc axit axetic băng). Pha loãng bằng nước đến 1 L.

CHÚ THÍCH: Đối với các chế phẩm enzym có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae* hoặc *Rhizopus oryzae*, chỉnh đến pH $5,0 \pm 0,05$.

4.3 Dung dịch chuẩn p-nitrophenol (PNP)

CẢNH BÁO: Tránh tiếp xúc với da. Nếu da bị dính PNP hoặc dung dịch PNP, phải rửa sạch vùng da bị dính thuốc thử bằng nước. Chuẩn bị dung dịch trong khu vực thoáng khí.

4.3.1 Dung dịch chuẩn gốc PNP, 0,001 M

Cân 139,11 mg PNP (đã sấy ở 60 °C không quá 4 h), hòa tan trong nước và pha loãng đến 1 L.

4.3.2 Dung dịch chuẩn làm việc PNP, 0,006 $\mu\text{mol/mL}$

Lấy chính xác 3,0 mL dung dịch chuẩn gốc PNP (4.3.1), thêm 125 mL dung dịch natri cacbonat (4.1), pha loãng bằng nước đến 500 mL.

4.3.3 Dung dịch chuẩn làm việc PNP, 0,02 $\mu\text{mol/mL}$

Lấy chính xác 2,0 mL dung dịch chuẩn gốc PNP (4.3.1), thêm 25 mL dung dịch natri cacbonat (4.1), pha loãng bằng nước đến 100 mL.

4.3.4 Dung dịch chuẩn làm việc PNP, 0,05 $\mu\text{mol/mL}$

Lấy chính xác 5,0 mL dung dịch chuẩn gốc PNP (4.3.1), thêm 25 mL dung dịch natri cacbonat (4.1), pha loãng bằng nước đến 100 mL.

4.4 Dung dịch p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG)

Cân 0,1 g PNPG (ví dụ: No. N 1377, Sigma ¹⁾), chính xác đến 0,0001 g. Hòa tan trong dung dịch đệm axetat (4.2) và pha loãng đến 100 mL.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

- 5.1 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,02\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.2 Máy đo quang phổ, có thể đo ở bước sóng 400 nm, đã hiệu chuẩn độ chính xác của bước sóng.
- 5.3 Nhiệt kế, có thể nhúng một phần trong chất lỏng, được chia độ đến $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.4 Ống nghiệm, kích thước 16 mm x 150 mm.
- 5.5 Pipet, có thể phân phối các thể tích thích hợp.
- 5.6 Bình định mức, có nắp đậy kín hoặc nắp bằng thủy tinh mài.
- 5.7 Đồng hồ bấm giờ, độ chính xác $\pm 0,01$ min trong 240 min.
- 5.8 Máy trộn vortex.

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

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Hòa tan $1,00\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ phần mẫu thử trong dung dịch đệm axetat (4.2) để thu được dung dịch mẫu thử có chứa khoảng 0,1 U/mL đến 0,3 U/mL.

¹⁾ Đây là ví dụ về sản phẩm thương mại có sẵn và thích hợp. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm nêu trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

7.2 Xác định hoạt độ

7.2.1 Đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch chuẩn PNP [(4.3.2) đến (4.3.4)] trong cuvet 1 cm ở bước sóng 400 nm so với mẫu trắng là nước.

7.2.2 Ổn định dung dịch PNPG (4.4) ở 50 °C trong nồi cách thủy (5.1) tối thiểu 15 min.

7.2.3 Lấy chính xác 2,0 mL dung dịch mẫu thử (7.1) vào ống nghiệm (5.4). Vặn chặt nắp, đặt ống nghiệm vào nồi cách thủy ở 50 °C (5.1), để ổn định trong 5 min. Sau đó, lấy ống nghiệm ra khỏi nồi cách thủy, thêm 2,0 mL dung dịch PNPG (4.4) đã ổn định, trộn đều bằng máy trộn vortex (5.8). Chuyển ống nghiệm trở lại nồi cách thủy. Bắt đầu tính thời gian. Sau chính xác 10 min ù, thêm 3,0 mL dung dịch natri cacbonat (4.1), trộn đều bằng máy trộn Vortex (5.8). Không đưa ống nghiệm trở lại nồi cách thủy.

7.2.4 Chuẩn bị dung dịch thử trắng bằng cách lấy chính xác 2,0 mL dung dịch mẫu thử (7.1) vào ống nghiệm (5.4), thêm 3,0 mL dung dịch natri cacbonat (4.1) và lắc. Thêm 2,0 mL dung dịch PNPG (4.4) đã ổn định và trộn đều.

7.2.5 Đo độ hấp thụ của từng dung dịch thử và dung dịch thử trắng trong cuvet 1 cm so với nước ở bước sóng 400 nm. Tiến hành đo độ hấp thụ trong khoảng 20 min tính từ khi thêm dung dịch natri cacbonat.

8 Tính kết quả

a) Tính độ hấp thụ quang riêng phần của dung dịch chuẩn PNP, ϵ , theo Công thức (1):

$$\epsilon = \frac{A}{C} \quad (1)$$

Trong đó:

A là độ hấp thụ quang của dung dịch chuẩn PNP ở bước sóng 400 nm (xem 7.2.1).

C là nồng độ dung dịch PNP tương ứng, tính bằng micromol trên mililit (ở đây $C = 0,006 \mu\text{mol/mL}$; $0,02 \mu\text{mol/mL}$; $0,05 \mu\text{mol/mL}$).

Độ hấp thụ quang riêng phần trung bình có giá trị khoảng $18,2 \text{ mL}/\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$.

b) Tính hoạt độ glucoamylase của mẫu thử, X , biểu thị bằng đơn vị hoạt độ trên gam (U/g), theo Công thức (2):

$$X = \frac{(A - A_b) \times 7 \times F}{\epsilon \times 10 \times 0,10 \times W \times 2} \quad (2)$$

Trong đó:

- A là độ hấp thụ của dung dịch thử (xem 7.2.5);
- A_0 là độ hấp thụ của dung dịch thử trắng (xem 7.2.5);
- 7 là thể tích cuối cùng của dung dịch thử (xem 7.2.3), tính bằng mililit (mL);
- F là hệ số pha loãng, tính bằng mililit (mL);
- 10 là thời gian phản ứng, tính bằng min;
- $0,10$ là lượng PNP đã được giải phóng, tính bằng $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{đơn vị enzym})$;
- W là khối lượng phần mẫu thử (xem 7.1), tính bằng gam (g);
- 2 là thể tích dung dịch thử đã sử dụng (xem 7.2.3), tính bằng mililit (mL).

9 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- c) phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) 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;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.