

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10790:2015

Xuất bản lần 1

MALT – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG α -AMYLASE

Malt – Determination of α -amylase content

HÀ NỘI – 2015

Lời nói đầu

TCVN 10790:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo tiêu chuẩn của Hiệp hội Đồ uống châu Âu EBC Method 4.13 (2006) *α -Amylase content of malt*,

TCVN 10790:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F9 *Đồ uống* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Malt – Xác định hàm lượng α -amylase

Malt – Determination of α -amylase content

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng (hoạt độ) α -amylase của malt.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

TCVN 10787:2015, *Malt – Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử*.

TCVN 10788:2015, *Malt – Xác định độ ẩm – Phương pháp khối lượng*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Hàm lượng α -amylase (α -amylase content)

Hoạt độ α -amylase (α -amylase activity)

Lượng α -amylase dextrin hóa 1 g tinh bột tan trong 1 h ở 20 °C với sự có mặt của một lượng dư β -amylase.

4 Nguyên tắc

α -Amylase của malt được chiết bằng dung dịch natri clorua 5 g/lit ở nhiệt độ 20 °C. Thủy phân dextrin (5.4) bằng dịch chiết enzym thu được.

Ước tính lượng α -amylase bằng cách quan sát màu chuẩn tương ứng với nồng độ tinh bột còn lại trong dung dịch ở điểm kết thúc quá trình dextrin hóa.

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và nước đạt loại 3 theo TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), trừ khi có quy định khác.

5.1 β -amylase, dạng bột, không chứa α -amylase.

Chế phẩm β -amylase có hoạt lực diastase (năng lực đường hóa) 5 000 °L và phù hợp với các quy định sau:

- khi bổ sung ở mức sử dụng, sự thay đổi về mức độ dextrin hóa cơ chất sau một ngày và sau ba ngày khi sử dụng dịch malt chuẩn, không vượt quá 5 %;
- quá trình dextrin hóa dịch malt chuẩn của cơ chất, được chuẩn bị bằng cách thêm 500 mg β -amylase (thay cho 250 mg cơ chất chuẩn), không được thay đổi quá 5 % so với giá trị thu được từ cơ chất chuẩn, khi cả hai cơ chất được dextrin hóa 24 h sau khi chuẩn bị.

Bảo quản bột β -amylase trong lọ kín khí và giữ trong tủ lạnh. Để lọ đựng β -amylase ấm lên đến nhiệt độ phòng trước khi mở nắp để tránh ngưng tụ ẩm trong chế phẩm enzym lạnh.

5.2 Tinh bột tan đặc hiệu, sử dụng cho quá trình xác định hoạt lực diastase và α -amylase.

5.3 Dung dịch đệm axetat, pH 4,7

Trộn 120 ml axit axetic băng với nước đựng trong bình định mức 500 ml và thêm nước đến vạch.

Hòa tan 164 g natri axetat khan với nước đựng trong bình định mức 500 ml và thêm nước đến vạch.

Trộn hai dung dịch nêu trên cho đến khi đạt được pH 4,7 ở 25 °C.

5.4 Dung dịch dextrin (α -amylodextrin), 20 g/l

Cân một lượng tinh bột (5.2) tương ứng với $10 \text{ g} \pm 0,005 \text{ g}$ chất khô, khuấy với 100 ml nước lạnh thành dạng sền sệt. Đổ từ từ hỗn hợp này vào 300 ml nước sôi đựng trong cốc có mỏ, vừa đun sôi vừa khuấy trong 1 min đến 2 min. Sau đó đặt cốc trong nước lạnh, khuấy để làm nguội đến 20 °C.

Hòa tan 100 mg β -amylase với một ít nước. Bổ sung dung dịch enzym này và 25 ml dung dịch đệm axetat (5.3) vào dung dịch tinh bột. Thêm nước cất đã bão hòa toluen đến tổng thể tích 500 ml.

Bảo quản dung dịch ở 20 °C trong thời gian từ 18 h đến 72 h trước khi sử dụng.

5.5 Dung dịch natri clorua, 5 g/l

Cân 5 g natri clorua, hòa tan trong nước đựng trong bình định mức 1 lít và thêm nước đến vạch.

5.6 Dung dịch gốc iot

Cân 5,5 g iốt và 11 g kali iodua, hòa vào nước đựng trong bình định mức 250 ml và thêm nước đến vạch. Bảo quản dung dịch trong chai màu nâu, dùng trong tháng.

5.7 Dung dịch iot pha loãng

Cân 20 g kali iodua, hòa vào nước đựng trong bình định mức 500 ml, thêm 2,0 ml dung dịch gốc iốt (5.6) và thêm nước đến vạch.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Máy nghiền đĩa, có khoảng cách giữa hai đĩa nghiền là 0,2 mm (ví dụ: máy nghiền đĩa Bühler Miag Disc Mill, kiểu DLFU của hãng Bühler GmbH, Đức).

6.2 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 g.

6.3 Bể ổn nhiệt, có thể duy trì nhiệt độ 20 °C $\pm$ 0,05 °C.

6.4 Phễu lọc, đường kính phễu 200 mm, cuống phễu chạm đến đáy bình nón.

6.5 Giấy lọc gấp nếp, đường kính 320 mm.

6.6 Đĩa màu đặc dụng (ví dụ: Hellige hoặc Lovibond)

Các đĩa phải chứa chuẩn màu đơn tương ứng với nồng độ tinh bột còn lại trong dung dịch ở thời điểm kết thúc quá trình dextrin hóa.

6.7 Máy so màu (ví dụ: Hellige hoặc Lovibond).

6.8 Cuvet quang học, bằng thủy tinh, (ví dụ: Hellige chiều dài đường quang 13,0 mm hoặc Lovibond 13,5 mm).

Các đĩa màu α -amylase chỉ cho giá trị chính xác khi sử dụng cuvet quang học đúng loại.

6.9 Đồng hồ tính giây.

TCVN 10790:2015

6.10 Bình nón, dung tích 50 ml và 1 000 ml.

6.11 Ống nghiệm, kích thước 25 mm x 150 mm.

6.12 Pipet, có thể phân phối các thể tích 2 ml, 5 ml, 10 ml và 20 ml.

7 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 10787:2015.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 10787:2015.

Cân hai phần mẫu thử, mỗi phần khoảng 26 g, chính xác đến 0,01 g và nghiền bằng máy nghiền (6.1).

9 Cách tiến hành

9.1 Chiết

Cân $25 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ malt đã nghiền, chính xác đến 0,01 g, chuyển nhanh vào bình nón 1 000 ml (6.10), rót 500 ml dung dịch natri clorua (5.5) vào và lắc mạnh. Đặt bình nón vào bể ổn nhiệt (6.3) ở 20°C , giữ ở nhiệt độ này trong 2,5 h, cứ 20 min xoay bình một lần.

9.2 Lọc

Lắc mạnh bình nón để trộn đều hỗn hợp rồi lọc ngay. Lọc lại 50 ml dịch lọc đầu tiên và cho vào phễu chiết (6.4).

9.3 Phép xác định

Pha loãng 20 ml dịch lọc với dung dịch natri clorua (5.5) để thu được 100 ml.

Duy trì nhiệt độ dung dịch dextrin (5.4), dịch chiết malt đã pha loãng và đầy các ống nghiệm (6.11) có chứa 10 ml dung dịch iot pha loãng (5.7) ở $20^\circ\text{C} \pm 0,05^\circ\text{C}$ trong bể ổn nhiệt (6.3).

Chuyển 10 ml dịch chiết malt đã pha loãng vào bình nón 50 ml (6.10) hoặc ống nghiệm (6.11), đặt vào bể ổn nhiệt $20^\circ\text{C} \pm 0,05^\circ\text{C}$ trong 5 min.

Thêm 20 ml dung dịch dextrin, ghi lại thời điểm bắt đầu. Trộn đều hỗn hợp bằng cách thổi pipet, để phòng nhiễm nước bọt.

Sau 10 min phản ứng, thêm 2 ml hỗn hợp thủy phân vào ống nghiệm có chứa 10 ml dung dịch iot pha loãng đã chỉnh nhiệt độ, trộn đều và chuyển ngay vào cuvet quang học (6.8). So sánh với đĩa màu α -amylase trong máy so màu (6.7).

Thêm tiếp 2 ml các hỗn hợp phản ứng trên vào ống nghiệm có chứa dung dịch iot pha loãng (5.7), trộn đều và kiểm tra trong máy so màu (6.7) đến khi nhìn thấy rõ chuẩn màu α -amylase. Sử dụng cùng một cuvet quang học để so màu và chỉ rửa cuvet khi đọc mẫu khác.

Đến gần điểm kết thúc, các hỗn hợp phản ứng được bổ sung sau mỗi 0,5 min, dùng pipet kiểu nhỏ giọt hoặc pipet kiểu thổi ra để có các thể tích 2 ml.

Ước tính điểm kết thúc đến 0,25 min. Để có kết quả chính xác, thời gian dextrin hóa nên trong khoảng từ 15 min đến 25 min. Nếu thời gian ngắn hơn thì lấy 5 ml dịch chiết malt đã pha loãng và 5 ml dung dịch natri clorua thay cho 10 ml dịch chiết malt đã pha loãng để dextrin hóa. Nếu thời gian lâu hơn thì pha loãng dịch chiết enzym ban đầu với tỉ lệ khác.

10 Tính và biểu thị kết quả

Hàm lượng α -amylase của mẫu thử, X_1 , biểu thị theo đơn vị dextrin hóa (DU), được tính theo Công thức (1):

$$X_1 = \frac{24}{m \times T} \quad (1)$$

Hàm lượng α -amylase của mẫu thử tính theo chất khô, X_2 , biểu thị theo đơn vị dextrin hóa (DU), được tính theo Công thức (2):

$$X_2 = \frac{X_1 \times 100}{100 - w} \quad (2)$$

Trong đó:

24 là khối lượng của tinh bột đã sử dụng (0,4 g) nhân với thời gian (60 min);

m là khối lượng malt trong dịch chiết đã pha loãng, tính bằng gam (g);

T là thời gian dextrin hóa, tính bằng phút (min);

w là độ ẩm của malt, tính bằng phần trăm khối lượng, xác định được theo TCVN 10788:2015.

Biểu thị kết quả đến một chữ số thập phân.

11 Độ chụm

Các giá trị độ chụm dưới đây được xác định từ dữ liệu thử nghiệm liên phòng do Ủy ban phân tích của EBC thực hiện năm 1991. Các phòng thử nghiệm tham gia đã phân tích các mẫu malt với bốn mức hàm lượng α -amylase từ 30 DU đến 100 DU. Các giá trị độ chụm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với dải nồng độ và chất nền đã nêu.

11.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập, đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong cùng một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 0,067 lần giá trị trung bình.

11.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 10 DU.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, hoặc nếu thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] AOAC 955.22 *Alpha-amylase in malt. Titrimetric method*
-