

中华人民共和国国家标准

食品添加剂  
固定化葡萄糖异构酶制剂

Food additive  
Immobilized glucose isomerase preparation

UDC 661.733  
: 664  
GB 8274-87

本标准适用于微生物发酵法生成的酶经固定化制成的固定化葡萄糖异构酶。

1 技术要求

1.1 外观：不结块，无异味。

1.2 项目和指标

项 目	指 标
酶活力, u/g	不低于 2 000
生产能力, t/kg	不低于 1.5
酶活力保存率 (%) 0.5℃, 三个月	不低于 85
强度	合格
重金属 (以 Pb 计), %	不超过 0.004
铅, %	不超过 0.001
砷 (以 As 计), %	不超过 0.000 3
黄曲霉毒素 B, %	不超过 0.000 000 5
大肠菌群, 个/100g	不超过 30
沙门氏菌	不得检出

注：生产使用的菌株和固定化酶需经毒性鉴定方能使用。

2 试验方法

2.1 外观：用目视判定。

2.2 酶活力测定

中华人民共和国轻工业部 1987-10-19 批准

1988-02-01 实施

## 2.2.1 酶促反应方法 I (适用于链霉菌产生的葡萄糖异构酶)

## 2.2.1.1 试剂

2.2.1.1.1 70% (W/V) 葡萄糖溶液: 称取 70 克分析纯葡萄糖加入煮沸的蒸馏水中, 再加热使其完全溶解, 冷却用蒸馏水定容至 100mL。

## 2.2.1.1.2 pH7.5 磷酸缓冲溶液:

0.2M 磷酸二氢钠 (GB 1267) 溶液: 称取 31.2g 磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 用蒸馏水溶解并稀释至 1 000mL。

0.2M 磷酸氢二钠 (GB 1263) 溶液: 称取 71.6g 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 用蒸馏水溶解并稀释至 1 000mL。

取一定量上述二溶液混合, 用 pH 计校正 pH 至 7.5。

2.2.1.1.3 0.5M 硫酸镁 (GB 671) 溶液: 称取 12.3g 硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 加蒸馏水溶解, 用蒸馏水定容至 100mL。

2.2.1.1.4 0.5M 高氯酸 (GB 623) 溶液: 量取 21mL 高氯酸 ( $\text{HClO}_4$ ), 用蒸馏水定容至 500mL。

2.2.1.2 反应: 固定称取合适量的酶 (用固定化酶完整颗粒, 不磨碎), 用 0.02M 磷酸缓冲液 (pH7.5) 1mL 在 3~7℃ 浸泡 16h, 加磷酸缓冲液 1.5mL, 硫酸镁溶液 0.5mL, 葡萄糖溶液 1.5mL, 再加蒸馏水调整至总体积 5mL, 70℃ 反应 1h, 加高氯酸溶液 5mL 终止反应, 然后测定果糖含量。

## 2.2.2 酶促反应方法 II (适用于游动放线菌产生的葡萄糖异构酶)。

## 2.2.2.1 试剂

2.2.2.1.1 3.0M 葡萄糖溶液: 称取分析纯无水葡萄糖 54g, 加煮沸蒸馏水使其溶解, 并定容至 100mL。

2.2.2.1.2 0.3M 磷酸缓冲溶液 (pH7.0): 称取 107.4g 分析纯磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 加蒸馏水溶解并定容至 1L (A 液); 称取 46.3g 分析纯磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (GB 1267), 加蒸馏水溶解, 并定容至 1L (B 液)。各取一定量 A、B 液混合, 用 pH 计校正 pH 至 7.0。

2.2.2.1.3 0.03M 硫酸镁溶液: 称取 0.739g 分析纯硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 加蒸馏水溶解, 并定容至 100mL。

2.2.2.1.4 0.003M 硫酸钴溶液: 称取 0.084 3g 分析纯硫酸钴 ( $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 加蒸馏水溶解, 并定容至 100mL。

2.2.2.2 反应: 固定称取合适量的酶 (用固定化酶完整颗粒, 不磨碎); 用 0.03M 磷酸缓冲液 (pH7.0) 1mL 在 3~7℃ 浸泡 16h, 加磷酸缓冲液 0.5mL, 硫酸钴溶液 0.5mL, 硫酸镁溶液 0.5mL, 葡萄糖溶液 2.5mL, 加蒸馏水调整至总体积 5mL。75℃ 反应 1h, 加高氯酸溶液 5mL 终止反应, 然后测定果糖含量。

## 2.2.3 果糖测定法 (半胱氨酸-咪唑法)

## 2.2.3.1 试剂

2.2.3.1.1 1.5% (W/V) 半胱氨酸盐酸盐溶液: 称取生化试剂纯半胱氨酸盐酸盐 0.375g, 用蒸馏水溶解, 并稀释定容至 25mL。

2.2.3.1.2 0.12% (W/V) 咪唑酒精溶液: 称取咪唑 30.0mg, 用无水酒精溶解并定容至 25mL, 放置在棕色瓶中, 24h 后使用。

2.2.3.1.3 硫酸溶液: 量取分析纯浓硫酸 450mL, 在不断搅拌下徐徐倒入 190mL 蒸馏水中。

2.2.3.1.4 标准果糖溶液: 称取预先在 55℃ 真空干燥至恒重的分析纯果糖 125.0mg, 用蒸馏水定容至 25mL (5mg/mL), 存放于冰箱中备用。使用时稀释 100 倍 (50μg/mL)。

## 2.2.3.2 测定程序

2.2.3.2.1 标准曲线的绘制: 取 25mL 比色管分别加 50μg/mL 的果糖标准溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8mL, 再用蒸馏水分别补充至 1mL, 然后每管中加入 0.2mL 半胱氨酸盐酸盐溶液, 6mL 硫酸溶液,

摇匀后，立即加入 0.2mL 吡啶酒精溶液，摇匀，于 60℃ 水浴中保温 10min，取出用水冷却呈红紫色。用 10mm 光径的比色皿，在 560nm 波长下比色，以吸光度对果糖作图，即得标准曲线。

2.2.3.2.2 样品测定：将 2.2.1.2 或 2.2.2.2 的反应终止溶液适当稀释后，准确吸取 1.0mL，使其中果糖含量在 10~40μg 范围内，然后按 2.2.3.1.2 的后步操作进行。根据获得的吸光度在标准曲线图上查得相应的果糖量。

### 2.2.3.3 计算

$$X = \frac{u}{W} \dots\dots\dots (1)$$

式中：X —— 酶活力，u/g；

u —— 酶单位，u；

W —— 样品量，g。

注：① GIU —— 酶单位的规定：酶在上述方法 I 或方法 II 的反应条件下，每小时生成 1mg 果糖的酶量规定为 1 个单位，以 GIU 表示。将其除以 10.8 即为国际单位，此时以 1GIU 表示。

② 果糖 (mg/h) —— 根据吸光度在标准曲线图上查得的果糖微克数 × 稀释倍数 × 1000。

### 2.3 生产能力

生产能力是指在适宜的工作条件下，酶活力降至原来活力的 10% 时，每公斤绝干固定化酶能转化绝干葡萄糖为果葡糖的量，以 t/kg 表示。果葡糖中果糖含量为 42% (W/W)。

$$P = \frac{\Sigma S}{W \cdot 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：P —— 生产能力，t/kg；

ΣS —— 转化糖量的总和，kg；

W —— 转化时所用固定化酶的量，kg。

### 2.4 酶活力保存率

$$X_2 = \frac{E}{E_0} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

式中：X<sub>2</sub> —— 酶活力保存率，%；

E —— 剩余活力；

E<sub>0</sub> —— 原酶活力。

### 2.5 强度

固定化酶用 60℃ 蒸馏水浸没，然后缓慢搅动 20h，再用两个手指用力压之，放开后不成浆（或极少量成浆）仍硬，为合格。否则，为不合格。

### 2.6 重金属测定

#### 2.6.1 试剂

2.6.1.1 硝酸：分析纯；

2.6.1.2 硫酸：分析纯；

2.6.1.3 盐酸：分析纯；

2.6.1.3.1 6N 盐酸：量取 500mL 盐酸，用蒸馏水稀释至 1000mL；

2.6.1.3.2 1N 盐酸：量取 83mL 盐酸，用蒸馏水稀释至 1000mL

2.6.1.4 氨水：分析纯；

2.6.1.4.1 5N 氨水：量取 333mL 氨水，用蒸馏水稀释至 1000mL；

2.6.1.4.2 1N 氨水：量取 66mL 氨水，用蒸馏水稀释至 1000mL；

2.6.1.5 pH3.5 的乙酸盐缓冲液：称取 25.0g 乙酸铵溶于 25mL 蒸馏水中，加 45mL 6N 盐酸，用稀盐酸或稀氨水调节 pH 至 3.5，用蒸馏水稀释至 100mL；

2.6.1.6 1% 酚酞指示液：按 GB 603 配制。

2.6.1.7 饱和硫化氢水：按 GB 603 配制（此溶液于使用前制备）。

2.6.1.8 铅标准溶液（每毫升含 0.01mg 铅）：按 GB 602 配制。临用前用蒸馏水准确稀释 10 倍，使成每毫升相当于 0.01mg 铅。

## 2.6.2 测定手续

### 2.6.2.1 样品处理

称取 5.0g 样品置于 250mL 凯氏烧瓶或三角烧瓶中，加 10~15mL 硝酸浸润样品放置片刻（或过夜）后，缓缓加热，待作用缓和后稍冷，沿瓶壁加入 5mL 硫酸再缓缓加热，至瓶中溶液开始变成棕色，不断滴加硝酸（如有必要可滴加些高氯酸）至有机质分解完全，继续加热，至生成大量的二氧化硫白色烟雾，最后溶液应呈无色或微带黄色。冷却后将溶液移入 50mL 容量瓶中，用水洗涤三角烧瓶，将洗液并入容量瓶中，加蒸馏水至刻度，混匀，每 10mL 该溶液相当于 1g 样品。

取同样量的硝酸、硫酸按上述方法作试剂空白试验。

### 2.6.2.2 样品测定

2.6.2.2.1 溶液 A：吸取含铅标准液 1mL 于 50mL 纳氏比色管中，加水至 25mL 混匀，加 1 滴 1% 酚酞指示液，用稀盐酸或稀氨水调节 pH 至中性（酚酞红色褪去）。加入 pH3.5 的乙酸盐缓冲液 5mL，用蒸馏水稀释至 40mL，混匀备用。

2.6.2.2.2 溶液 B：取一支与溶液 A 所配套的纳氏比色管，加入 20mL 样品液，加蒸馏水至 25mL 混匀，加 1 滴 1% 酚酞指示液，用稀盐酸或稀氨水调节 pH 至中性（酚酞红色褪去），加入 pH3.5 的乙酸盐缓冲液 5mL，用蒸馏水稀释至 40mL，混匀备用。

2.6.2.2.3 溶液 C：取一支与溶液 A、B 所配套的纳氏比色管，加入与溶液 B 相同量的相同的样品液，再加入与溶液 A 相同量的铅标准液，加蒸馏水至 25mL，混匀，加 1 滴 1% 酚酞指示液，用稀盐酸或稀氨水调节 pH 至中性（酚酞红色刚褪去），加入 pH3.5 的乙酸盐缓冲液 5mL，用蒸馏水稀释至 40mL，混匀备用。

2.6.2.2.4 向各管中加入 10mL 新鲜制备的硫化氢饱和液，混匀，放置 10min 后在白色背景下观察，溶液 B 的色度不得深于溶液 A 的色度，溶液 C 的色度应与溶液 A 的色度相当或深于溶液 A 的色度。

## 2.7 铅

按 GB 5009.12《食品中铅的测定方法》中的双硫脲单色法执行。样品处理采用硝酸-硫酸法。

## 2.8 砷

按 GB 5009.11《食品中砷的测定方法》中的银盐法执行。样品处理采用硝酸-硫酸法。

## 2.9 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

按 GB 5009.22《食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的测定方法》执行。

## 2.10 大肠菌群

按 GB 4789.3《食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定》执行。

## 2.11 沙门氏菌

按 GB 4789.3《食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验》执行。

## 3 检验规则

3.1 产品需经生产厂技术部门检验，并签发合格证方可出厂。生产厂以一批次发酵罐培养的酶经固化后制得的固定化酶为同一批次的产品。

3.2 订货单位若需抽样检验，应从该批酶中抽取两份，按本标准规定的试验方法进行检验，若有一个样品或一项指标不符合标准的要求时，应与生产厂协商，再取 1 倍量的同批样品共同进行复验，如仍不合格时，则全批产品作为不合格产品，退交生产厂处理。若产品经复验合格时，订货方应承担试验费用。

#### 4 标志、包装、运输、贮存

4.1 固定化葡萄糖异构酶的外包装应用硬纸板箱，除注明品名、生产厂名、规格、注册商标外，还应注明食品添加剂，箱里并应附有产品检验合格证。合格证上印有品名、颗粒说明、所用菌种、批号、数量、规格、生产日期、检验员等。

4.2 内包装为食品用塑料袋，应印有注册商标、产品名称、规格、重量、生产厂名。

4.3 本品含有生物活性物质，对光线、温度、湿度易引起失活，在运输途中应避免日光曝晒和雨淋，贮存仓库应保持清洁、阴凉、干燥、通风。

---

#### 附加说明：

本标准由中华人民共和国轻工业部、卫生部提出。

本标准由轻工业部食品发酵工业科学研究所、卫生部食品卫生监督检验所归口。

本标准由轻工业部食品发酵工业科学研究所、天津市防病中心、无锡酶制剂厂负责起草。