



中华人民共和国国家标准

GB 5009.255—2016

食品安全国家标准 食品中果聚糖的测定

2016-08-31 发布

2017-03-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

食品安全国家标准

食品中果聚糖的测定

1 范围

本标准规定了食品中果聚糖含量的离子色谱法测定方法。

本标准适用于乳及乳制品、婴幼儿配方食品、婴幼儿谷类辅助食品、固体饮料、配制酒中单独添加的低聚果糖、多聚果糖或菊粉含量的测定。

2 原理

试样经热水浸提,样液中的蔗糖经蔗糖酶水解成葡萄糖和果糖,葡萄糖和果糖经硼氢化钠还原成相应的糖醇,多余的硼氢化钠用乙酸中和。样液中的果聚糖经过果聚糖酶水解成果糖和葡萄糖,经离子色谱-脉冲安培检测器测定果糖含量,通过换算系数,折算得到果聚糖的含量。

3 试剂和材料

3.1 试剂

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 3.1.1 氢氧化钠(NaOH)。
- 3.1.2 马来酸($C_4H_4O_4$)。
- 3.1.3 蔗糖酶:来源于酵母,酶活力 ≥ 300 U。
- 3.1.4 硼氢化钠($NaBH_4$)。
- 3.1.5 冰乙酸(CH_3COOH)。
- 3.1.6 三水乙酸钠($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)。
- 3.1.7 果聚糖酶:来源于黑曲霉,酶活力 $\geq 10\ 000$ U。
- 3.1.8 50%氢氧化钠溶液(NaOH):色谱纯。
- 3.1.9 无水乙酸钠(CH_3COONa):纯度 $\geq 99.0\%$ 。
- 3.1.10 氮气(N_2):纯度 $\geq 99.9\%$ 。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 40 g 氢氧化钠(精确至 0.01 g),溶于水并稀释至 1 000 mL,室温下可放置 2 个月。
- 3.2.2 马来酸钠缓冲溶液(100 mmol/L, pH 6.5):称取 1.16 g 马来酸(精确至 0.01 g)于 150 mL 烧杯中,加入约 70 mL 水溶解,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 6.5,用水稀释至 100 mL。4 ℃ 保存,可放置 3 个月。
- 3.2.3 蔗糖酶溶液(4.5 U/mL):将蔗糖酶(活力为 300 U)溶解于 66 mL 马来酸钠缓冲溶液,分装到 2 mL 的离心管中,-20 ℃ 保存,可放置 6 个月。使用前需测定酶活力。
- 3.2.4 氢氧化钠溶液(50 mmol/L):称取 2 g 氢氧化钠(精确至 0.01 g),溶于水并稀释至 1 000 mL,室

温下可放置 2 个月。

3.2.5 硼氢化钠溶液(10 mg/mL):准确称取适量硼氢化钠(精确至 0.001 g)于聚丙烯离心管中,用 50 mmol/L 氢氧化钠溶液溶解,最终质量浓度为 10 mg/mL,用时现配。

3.2.6 乙酸溶液(200 mmol/L):吸取 0.6 mL 冰乙酸,用水稀释至 50 mL,4 °C 保存,可放置 2 个月。

3.2.7 乙酸钠溶液(200 mmol/L):称取 1.36 g 三水乙酸钠(精确至 0.01 g),溶于水并稀释至 50 mL,4 °C 保存,可放置 2 个月。

3.2.8 乙酸钠缓冲溶液(pH 4.5):吸取 14 mL 乙酸溶液和 11 mL 乙酸钠溶液混合,并用水稀释至 50 mL,用时现配。

3.2.9 果聚糖酶溶液(455 U/mL):将果聚糖酶(活力为 10 000 U)溶解于 22 mL 乙酸钠缓冲溶液,分装到 2 mL 的离心管中,-20 °C 保存,可放置 6 个月。使用前需测定酶活力。

3.2.10 氢氧化钠溶液(200 mmol/L):取 10.4 mL 50%氢氧化钠溶液,用水稀释至 1 000 mL,通入氮气保护,缓慢摇匀,室温下可放置 7 d。

3.2.11 氢氧化钠(150 mmol/L)乙酸钠(500 mmol/L)混合溶液:称取 41 g 无水乙酸钠(精确至 0.01 g),用约 500 mL 水溶解,0.22 μm 滤膜过滤,脱气 10 min,加入 7.8 mL 50%氢氧化钠溶液,并用水稀释至 1 000 mL,通入氮气保护,缓慢摇匀,室温下可放置 7 d。

3.3 标准物质

果糖标准物质($C_6H_{12}O_6$):纯度 $\geq 99.0\%$ 。

3.4 标准溶液的配制

3.4.1 果糖贮备溶液(2 000 mg/L):准确称取 0.05 g(精确至 0.1 mg)80 °C 烘干至恒重的果糖标准物质于 50 mL 烧杯中,加入约 10 mL 热水,待果糖溶解后,冷却至室温,用水稀释至 25 mL 容量瓶中,摇匀,4 °C 保存,可放置 1 个月。

3.4.2 果糖中间溶液(80.0 mg/L):吸取果糖贮备溶液 1 mL,用水稀释至 25 mL 容量瓶中,用时现配。

3.4.3 果糖标准曲线工作溶液:取适量果糖中间溶液,用水配制成质量浓度为 0.800 mg/L、1.60 mg/L、4.00 mg/L、8.00 mg/L、16.0 mg/L 的标准曲线工作溶液。

3.5 材料

3.5.1 净化柱:反相固相萃取柱,填料为苯乙烯二乙烯基苯,2.5 mL。

3.5.2 微孔滤膜:水相,0.22 μm。

4 仪器和设备

4.1 离子色谱仪:配有三元及以上梯度泵,脉冲安培检测器,Au 工作电极。

4.2 天平:感量为 0.1 mg、0.001 g 和 0.01 g。

4.3 pH 计:精度为 0.01 pH。

4.4 旋涡振荡器。

4.5 恒温水浴摇床:控温精度 ± 1 °C。

4.6 离心机:转速 $\geq 3\ 000$ r/min。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 试样预处理

5.1.1.1 固体样品:用“四分法”缩分至约 200 g 样品经粉碎机粉碎,混匀,备用。

5.1.1.2 液体样品:将试样装入能够容纳 2 倍试样体积的带盖容器中,摇匀,备用。

5.1.2 提取

准确称取 1 g~5 g(精确至 0.001 g,至少含有果聚糖 5 mg)试样于 150 mL 锥形瓶中,加入 80 °C ± 1 °C 热水约 50 mL,置于 80 °C ± 1 °C 恒温水浴摇床中,150 r/min 振摇 15 min 后,取出,冷却至室温,转移至 100 mL 容量瓶中,用水分三次冲洗锥形瓶,定容,摇匀,溶液经滤纸过滤或者离心,滤液或上清液依据标准曲线的线性范围确定稀释倍数,备用。

取上述备用样液 200 μL 于 10 mL 具塞玻璃试管中,估算样液中可能的蔗糖含量,按照每毫克蔗糖加入 300 μL 蔗糖酶溶液,旋涡振荡混匀,置于 40 °C ± 1 °C 恒温水浴摇床中,150 r/min 振摇 60 min 后,加入 300 μL 硼氢化钠溶液,旋涡振荡混匀,置于 40 °C ± 1 °C 恒温水浴摇床中,150 r/min 振摇 30 min 后,取出,冷却至室温。加入 750 μL 乙酸溶液,静置 10 min。估算样液中可能的果聚糖含量,按照每毫克果聚糖加入 1.2 mL 果聚糖酶溶液,旋涡振荡混匀,置于 40 °C ± 1 °C 恒温水浴摇床中,150 r/min 振摇 30 min 后,取出,冷却至室温。转移至 10 mL 容量瓶中,用水分三次冲洗玻璃试管,定容,摇匀。

活化净化柱,试样溶液依次通过 0.22 μm 水相滤膜和净化柱,弃去前面 3 倍柱体积洗脱液,收集后面洗脱液待测。同时做试剂空白试验。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 仪器参考条件 1

5.2.1.1 色谱柱:可兼容梯度洗脱的高容量阴离子交换色谱柱。

5.2.1.2 淋洗液:A:水;B:氢氧化钠溶液(200 mmol/L);C:氢氧化钠(150 mmol/L)乙酸钠(500 mmol/L)混合溶液。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	流速 mL/min	淋洗液 %			曲线
		A	B	C	
0~20	1.0	80	20	0	线性
20.1~30	1.0	0	0	100	线性
30.1~40	1.0	0	100	0	线性
40.1~50	1.0	80	20	0	线性

5.2.1.3 检测器:脉冲安培检测器,Au 工作电极,Ag/AgCl 参比电极,检测池温度 30 °C,果糖检测波形参见表 2。

表 2 果糖检测波形

时间 s	电位 V	积分	时间 s	电位 V	积分
0.00	+0.10	—	0.42	-2.00	—
0.20	+0.10	开始	0.43	+0.60	—
0.40	+0.10	结束	0.44	-0.10	—
0.41	-2.00	—	0.50	-0.10	—

5.2.1.4 柱温:30 ℃。

5.2.1.5 进样体积:10 μL 。

5.2.2 仪器参考条件 2

5.2.2.1 色谱柱:可兼容梯度洗脱的高容量阴离子交换色谱柱。

5.2.2.2 淋洗液:A:氢氧化钠溶液(90 mmol/L);B:氢氧化钠(150 mmol/L)乙酸钠(500 mmol/L)混合溶液。梯度洗脱条件见表 3:

表 3 梯度洗脱条件

时间 min	流速 mL/min	淋洗液 %		曲线
		A	B	
0~22	1.0	100	0	线性
22.1~35	1.0	0	100	线性
35.1~60	1.0	100	0	线性

5.2.2.3 脉冲安培检测器,Au 工作电极,Pd 参比电极,检测池温度 35 ℃,果糖检测波形参见表 4:

表 4 果糖检测波形

时间 s	电位 V	积分
0.00	+0.05	—
0.20	+0.05	开始
0.30	+0.05	结束
0.35	+0.55	—
0.55	-0.10	—

5.2.2.4 柱温:32 ℃。

5.2.2.5 进样体积:20 μL 。

5.3 标准曲线的制作

将标准曲线工作溶液从低到高依次注入离子色谱仪中,测定相应的响应值(峰面积),以标准工作液

中果糖的质量浓度为横坐标,以响应值(峰面积)为纵坐标,绘制标准曲线。标准溶液色谱图参见附录 A。

5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入离子色谱仪中,记录色谱图。根据保留时间定性,记录峰面积,根据标准曲线得到待测液中果糖的质量浓度。同时测定试剂空白。

6 分析结果的表述

试样中果聚糖含量按式(1)、式(2)、式(3)计算:

$$X = \frac{k_1 \times k_2 \times (c - c_0) \times V \times 10}{m \times 0.2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

$$k_1 = \frac{180 + 162 \times (n - 1)}{180 \times n} \dots\dots\dots (2)$$

$$k_2 = \frac{n}{n - 1} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- X —— 试样中果聚糖的含量,单位为克每千克(g/kg);
- k_1 —— 对果聚糖水解过程中增加的水分子进行校正;
- k_2 —— 对于 F_n 型果聚糖末端果糖基被还原和 GF_n 型果聚糖末端葡萄糖不被检测进行校正;
- c —— 试样测定液中果糖的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- c_0 —— 试剂空白测定液中果糖的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- V —— 试样定容体积,单位为毫升(mL);
- 10 —— 试样酶解液定容体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量,单位为克(g);
- 0.2 —— 用于酶解的样品溶液体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 —— 单位转换系数;
- n —— 平均聚合度,对于低聚果糖,按照 $n = 4$ 计算;对于多聚果糖,按照 $n = 23$ 计算;对于菊粉,按照 $n = 10$ 计算。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,保留三位有效数字。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

8 其他

当称样量为 5 g 时,检出限为 0.4 g/kg,定量限为 2.0 g/kg。

附录 A
果糖标准溶液、奶粉样品色谱图

A.1 果糖标准溶液色谱图(参考条件 1)

果糖标准溶液色谱图(参考条件 1)见图 A.1。

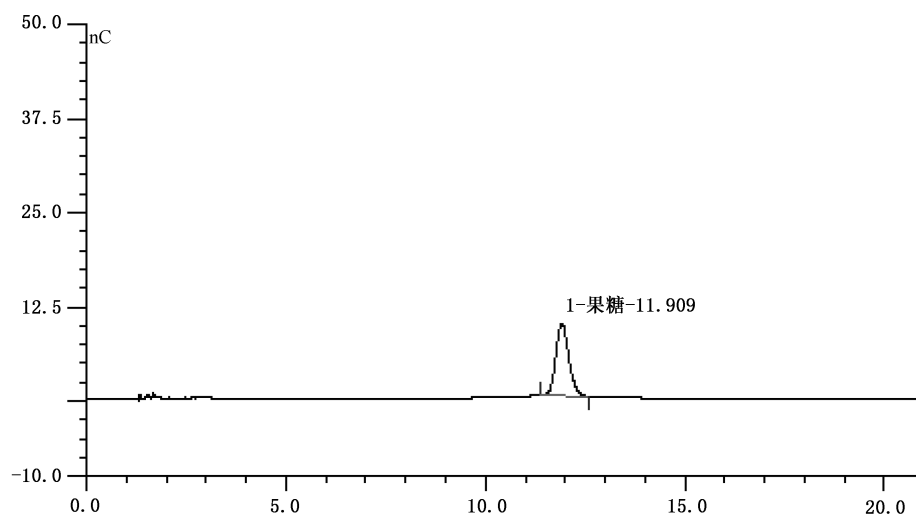


图 A.1 果糖标准溶液色谱图

A.2 奶粉样品色谱图(参考条件 1)

奶粉样品色谱图(参考条件 1)见图 A.2。

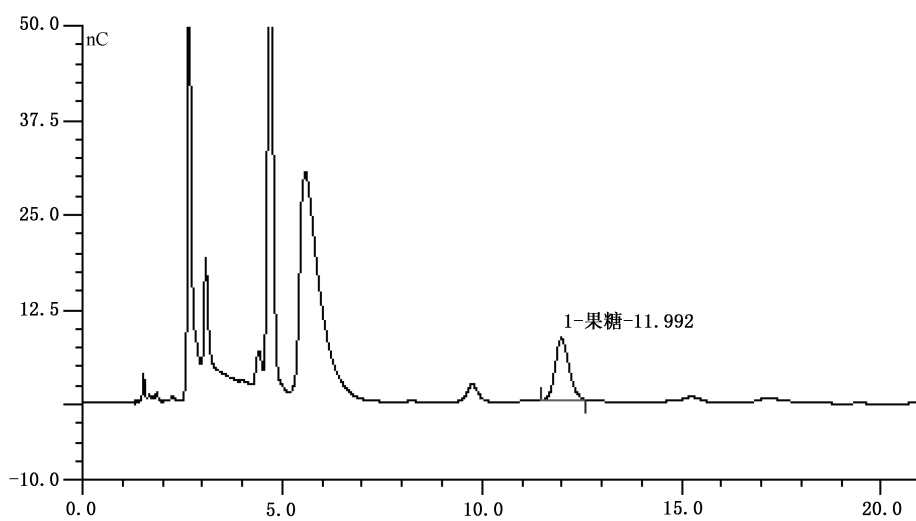


图 A.2 奶粉样品色谱图

A.3 果糖标准溶液色谱图(参考条件 2)

果糖标准溶液色谱图(参考条件 2)见图 A.3。

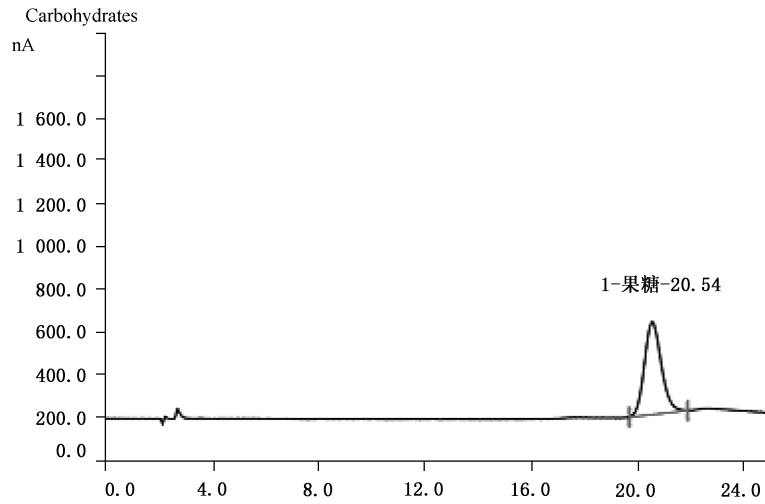


图 A.3 果糖标准溶液色谱图

A.4 奶粉样品色谱图(参考条件 2)

奶粉样品色谱图(参考条件 2)见图 A.4。

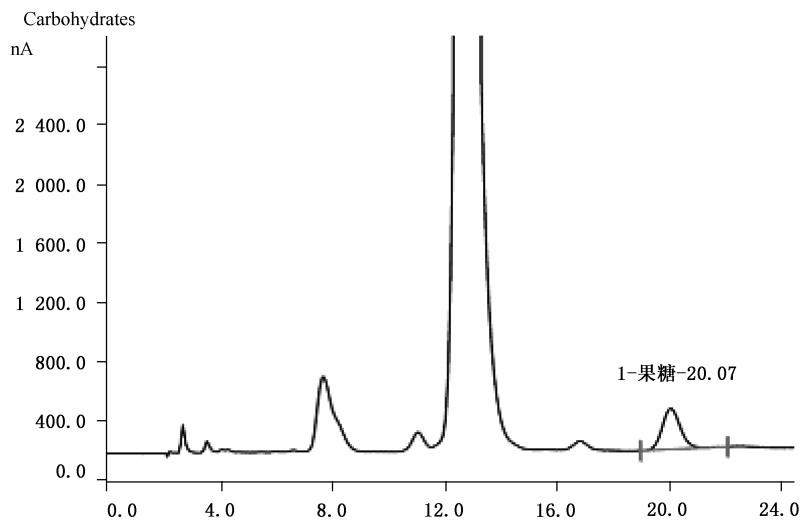


图 A.4 奶粉样品色谱图

附 录 B

酶活力测定方法

B.1 蔗糖酶活力测定方法

B.1.1 原理

蔗糖酶(Sucrase, EC 3.2.1.26)又称转化酶,可以从果糖末端切开蔗糖的果糖糖苷键,使蔗糖水解生成葡萄糖和果糖,葡萄糖和果糖是还原糖,其含量可通过 3,5-二硝基水杨酸比色法测定,从而度量酶活力的大小。由于蔗糖酶在碱性条件下极易失活,所以可用碱终止反应。3,5-二硝基水杨酸和还原糖共热后生成棕红色氨基化合物,在最大吸收波长 540 nm 处测定,在一定浓度范围内吸光值与还原糖含量呈线性关系,因此可用于还原糖含量的测定,从而测定蔗糖酶的活力大小。

蔗糖酶活力定义为:在 37 °C、pH 6.5 条件下,每分钟水解产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量(活性)定义为 1 个酶活力单位。

B.1.2 试剂

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

B.1.2.1 葡萄糖标准物质($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$):纯度 $\geq 99.0\%$ 。

B.1.2.2 蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$):纯度 $\geq 99.0\%$ 。

B.1.2.3 氢氧化钠(NaOH)。

B.1.2.4 马来酸($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$)。

B.1.2.5 二硝基水杨酸($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$)。

B.1.2.6 酒石酸钾钠($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$)。

B.1.2.7 苯酚($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)。

B.1.2.8 亚硫酸钠(Na_2SO_3)。

B.1.3 试剂配制

B.1.3.1 2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 葡萄糖标准溶液:准确称取 0.045 g(精确至 0.1 mg)80 °C 烘干至恒重的葡萄糖标准物质于 50 mL 烧杯中,加入约 10 mL 热水,待葡萄糖溶解后,冷却至室温,用水稀释至 100 mL 容量瓶中,摇匀,4 °C 保存,可放置 1 个月。

B.1.3.2 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 40 g 氢氧化钠(精确至 0.01 g),溶于水并稀释至 1 000 mL,室温下可放置 2 个月。

B.1.3.3 马来酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 6.5):称取 1.16 g 马来酸(精确至 0.01 g)于 150 mL 烧杯中,加入约 70 mL 水溶解,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.5,用水稀释至 100 mL,4 °C 保存,可放置 3 个月。

B.1.3.4 1.0 mol/L 蔗糖溶液:准确称取 34.2 g(精确至 0.01 g)蔗糖,用约 50 mL 水溶解,用马来酸钠缓冲溶液稀释至 100 mL,摇匀,用时现配。

B.1.3.5 氢氧化钠溶液(2 mol/L):称取 80 g 氢氧化钠(精确至 0.01 g),用水溶解并稀释至 1 000 mL,室温下可放置 2 个月。

B.1.3.6 3,5-二硝基水杨酸溶液:将 6.3 g 二硝基水杨酸和 262 mL 2 mol/L NaOH 溶液,加到 500 mL 含有 185 g 酒石酸钾钠的热水溶液中,再加 5 g 苯酚和 5 g 亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后用水稀释至

1 000 mL,贮于棕色瓶中备用。

B.1.4 仪器和设备

B.1.4.1 恒温水浴锅:控温精度 ± 1 °C。

B.1.4.2 分光光度计:带 1 cm 玻璃比色皿。

B.1.4.3 微量移液器:100 μ L、1 000 μ L。

B.1.5 分析步骤

B.1.5.1 待测酶的制备

准确称取测试酶样品约 0.1 g(精确 0.001 g),用 0.1 mol/L 马来酸钠缓冲溶液溶解并稀释,控制酶活力浓度在 1 U/mL~5 U/mL 范围内。

B.1.5.2 测定

B.1.5.2.1 葡萄糖标准曲线的制作

取 6 支 10 mL 刻度试管,编号,按表 B.1 配制不同浓度的葡萄糖标准溶液:

表 B.1 葡萄糖标准溶液

管号	1	2	3	4	5	6
葡萄糖原液量/mL	0	0.100	0.200	0.300	0.400	0.500
加水量/mL	1.00	0.900	0.800	0.700	0.600	0.500
葡萄糖浓度/ $(\mu\text{mol/mL})$	0	0.250	0.500	0.750	1.00	1.25

在上述各试管中分别加入 0.5 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液,混匀后于沸水浴中加热 10 min。取出后立即放入盛有冷水的烧杯中冷却至室温,用水定容至 5 mL,混匀,以 1 号试管为空白,用分光光度计测定波长 540 nm 处的吸光值。以吸光值为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

B.1.5.2.2 蔗糖酶活力的测定

取 10 mL 刻度试管,用微量移液器准确移取 1.0 mol/L 蔗糖溶液 0.8 mL,准确加入待测酶 0.1 mL,在 37 °C ± 1 °C 恒温水浴保温 30 min,取出后立即加入 0.1 mL 1 mol/L NaOH 溶液,摇匀以终止酶促反应。在相同的条件下,以沸水浴钝化酶液作为试剂空白。再向该溶液中加入 0.5 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液,混匀后于沸水浴中加热 10 min。取出后立即放入盛有冷水的烧杯中冷却至室温,用水定容至 5 mL,混匀。用分光光度计测定波长 540 nm 处的吸光值,由标准曲线计算待测酶测定液中和试剂空白测定液中葡萄糖的质量浓度。

B.1.6 计算

蔗糖酶活力按式(B.1)计算:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V}{V_x \times 30} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

X ——蔗糖酶活力,单位为活力单位每毫升(U/mL);

c ——待测酶测定液中葡萄糖的摩尔浓度,单位为微摩尔每毫升($\mu\text{mol/mL}$);

- c_0 ——试剂空白测定液中葡萄糖的摩尔浓度,单位为微摩尔每毫升($\mu\text{mol}/\text{mL}$);
- V ——酶水解液最终定容体积(5 mL),单位为毫升(mL);
- V_x ——待测酶的用量,单位为毫升(mL);
- 30 ——反应时间,单位为分(min)。

B.2 果聚糖酶活力测定方法

B.2.1 原理

果聚糖酶(Inulinase, EC 3.2.1.80)又称菊粉酶,是能够水解 β -2,1-D-果聚糖果糖苷键的一类水解酶,使菊粉水解生成葡萄糖和果糖,葡萄糖和果糖是还原糖,其含量可通过 3,5-二硝基水杨酸比色法测定,从而度量酶活力的大小。3,5-二硝基水杨酸和还原糖共热后生成棕红色氨基化合物,在最大吸收波长 540 nm 处测定,在一定浓度范围内吸光值与还原糖含量呈线性关系,因此可用于还原糖含量的测定,从而测定果聚糖酶的活力大小。

果聚糖酶活力定义为:在 55 °C、pH 4.5 条件下,每分钟水解产生 1 μmol 果糖所需的酶量(活性)定义为 1 个酶活力单位。

B.2.2 试剂

B.2.2.1 果糖标准物质($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$):纯度 $\geq 99.0\%$ 。

B.2.2.2 菊粉:纯度 $\geq 90.0\%$ 。

B.2.2.3 冰乙酸(CH_3COOH)。

B.2.2.4 三水乙酸钠($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。

B.2.2.5 二硝基水杨酸($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$)。

B.2.2.6 酒石酸钾钠($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$)。

B.2.2.7 苯酚($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)。

B.2.2.8 亚硫酸钠(Na_2SO_3)。

B.2.3 试剂配制

B.2.3.1 2.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 果糖标准溶液:准确称取 0.045 g(精确至 0.1 mg)80 °C 烘干至恒重的果糖标准物质于 50 mL 烧杯中,加入约 10 mL 热水,待果糖溶解后,冷却至室温,用水稀释至 100 mL 容量瓶中,摇匀,4 °C 保存,可放置 1 个月。

B.2.3.2 乙酸溶液(200 mmol/L):吸取 0.6 mL 冰乙酸,用水稀释至 50 mL,4 °C 保存,可放置 2 个月。

B.2.3.3 乙酸钠溶液(200 mmol/L):称取 1.36 g 三水乙酸钠(精确至 0.01 g),溶于水并稀释至 50 mL,4 °C 保存,可放置 2 个月。

B.2.3.4 乙酸钠缓冲溶液(pH 4.5):吸取 14 mL 乙酸溶液和 11 mL 乙酸钠溶液混合,并用水稀释至 50 mL,用时现配。

B.2.3.5 10% 菊粉溶液:准确称取 10 g(精确至 0.01 g)菊粉,用约 50 mL 热水溶解,冷却至室温,用乙酸钠缓冲溶液稀释至 100 mL 容量瓶中,摇匀,4 °C 保存,可放置 1 个月。

B.2.3.6 氢氧化钠溶液(2 mol/L):称取 80 g 氢氧化钠(精确至 0.01 g),溶于水中并稀释至 1 000 mL,室温下可放置 2 个月。

B.2.3.7 3,5-二硝基水杨酸溶液:将 6.3 g 二硝基水杨酸和 262 mL 2 mol/L NaOH 溶液,加到 500 mL 含有 185 g 酒石酸钾钠的热水溶液中,再加 5 g 苯酚和 5 g 亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后用水稀释至 1 000 mL,贮于棕色瓶中备用。

B.2.4 仪器和设备

B.2.4.1 恒温水浴锅:控温精度±1℃。

B.2.4.2 分光光度计:带1 cm玻璃比色皿。

B.2.4.3 微量移液器:100 μL、1 000 μL。

B.2.5 分析步骤

B.2.5.1 待测酶的制备

用乙酸钠缓冲溶液稀释测试酶样品,控制酶活力浓度在1 U/mL~5 U/mL范围内。

B.2.5.2 测定

B.2.5.2.1 果糖标准曲线的制作

取6支10 mL刻度试管,编号,按表B.2用去离子水配制不同浓度的果糖标准溶液。

表 B.2 果糖标准溶液

管号	1	2	3	4	5	6
果糖原液量/mL	0	0.100	0.200	0.300	0.400	0.500
加水量/mL	1.00	0.900	0.800	0.700	0.600	0.500
果糖浓度/(μmol/mL)	0	0.250	0.500	0.750	1.00	1.25

在上述各试管中分别加入0.5 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液,混匀后于沸水浴中加热10 min。取出后立即放入盛有冷水的烧杯中冷却至室温,用水定容至5 mL,混匀,以1号试管为空白,用分光光度计测定波长540 nm处的吸光值。以吸光值为纵坐标,果糖质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

B.2.5.2.2 菊粉酶活力的测定

取10 mL刻度试管,用微量移液器准确移取0.9 mL 10%菊粉溶液,准确加入待测酶0.1 mL,在55℃±1℃恒温水浴保温20 min,沸水浴中加热5 min,以终止酶促反应。在相同的条件下,以沸水浴钝化酶液作为试剂空白。再向该溶液中加入0.5 mL 3,5-二硝基水杨酸溶液,混匀后于沸水浴中加热10 min。取出后立即放入盛有冷水的烧杯中冷却至室温,用水定容至5 mL,混匀。用分光光度计测定波长540 nm处的吸光值,由标准曲线计算待测酶测定液中和试剂空白测定液中果糖的质量浓度。

B.2.6 计算

果聚糖酶活力按式(B.2)计算:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V}{V_x \times 20} \dots\dots\dots (B.2)$$

式中:

X ——果聚糖酶活力,单位为活力单位每毫升(U/mL);

c ——待测酶测定液中果糖的摩尔浓度,单位为微摩尔每毫升(μmol/mL);

c₀ ——试剂空白测定液中果糖的摩尔浓度,单位为微摩尔每毫升(μmol/mL);

V ——酶水解液最终定容体积(5 mL),单位为毫升(mL);

V_x ——待测酶的用量,单位为毫升(mL);

20 ——反应时间,单位为分(min)。