



中华人民共和国国家标准

GB 20713—2006

食品添加剂 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂

Food additive— α -acetolactate decarboxylase preparation



2006-07-18 发布

2007-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布



中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
食品添加剂 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂
GB 20713—2006

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 21 千字
2007 年 4 月第一版 2007 年 4 月第一次印刷

*

书号: 155066 · 1-29229 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话: (010)68533533



GB 20713-2006

前 言

本标准的 4.3 为强制性条款,其余为推荐性条款。

本标准的附录 A 和附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国国家食品药品监督管理局提出。

本标准由全国食品发酵标准化中心和中国疾病预防控制中心营养与食品安全所归口。

本标准起草单位:诺维信(中国)生物技术有限公司、南宁邦尔克生物技术有限责任公司。

本标准主要起草人:翟文景、黄日波、田惠光、侯炳炎、田栖静、信力行、蔺继尚、赵力、蒙健宗。

引 言

α -乙酰乳酸脱羧酶是目前广泛用于啤酒生产的食品添加剂。在 GB 2760—1996《食品添加剂使用卫生标准》1997 年增补品种中,已批准了 α -乙酰乳酸脱羧酶可以在啤酒工艺中按照正常生产需要适量使用。

本标准参考了联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会(JECFA)《食品加工用酶制剂的通用规范和说明》(食品添加剂标准纲要,附件 9)以及美国《食品化学品法典》第 4 版(FCC-IV)第 3 增刊中的有关要求,同时根据我国国情增加了菌落总数、重金属和砷的要求。生产商在使用该标准的同时,建议同时参照相应法律、法规和规范(如采用良好操作规范等),进一步提高产品的安全性。

本标准附录 A 的方法修改采用 JECFA 方法,附录 B 的方法参考了诺维信生物技术有限公司的全自动生化分析仪法。



目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 要求 1

5 试验方法 2

6 检验规则 3

7 标志、包装、运输和贮存 3

附录 A(规范性附录) α -乙酰乳酸脱羧酶酶活力的测定 分光光度法 4

附录 B(规范性附录) α -乙酰乳酸脱羧酶酶活力的测定 全自动生化分析仪法 7

食品添加剂 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂

1 范围

本标准规定了 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂的术语和定义、要求、试验方法、检验规则、标志、包装、运输和贮存。

本标准适用于符合 GB 2760 要求的用于啤酒生产的 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB 2760 食品添加剂使用卫生标准

GB/T 4789.2 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定

GB/T 4789.3 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

GB/T 4789.4 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检测

GB/T 4789.6 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验

GB/T 5009.74 食品添加剂中重金属限量试验

GB/T 5009.75 食品添加剂中铅的测定

GB/T 5009.76 食品添加剂中砷的测定

JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则

国家质量监督检验检疫总局[2005]第 75 号令 定量包装商品计量监督管理办法

卫生部[2002]第 26 号令 食品添加剂卫生管理办法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

α -乙酰乳酸脱羧酶活力单位 α -acetolactate decarboxylase(ADU)

在 30℃、pH 6.0 的条件下,1 g 或 1 mL 酶样品与底物 α -乙酰乳酸起反应,每分钟生成 1 μ mol 的 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻),即为 1 个酶活力单位,以 U/g(或 U/mL)表示。

注:1 U = 1 000 mU。

4 要求

4.1 外观

液体剂型:淡黄色、棕色至褐色液体。无异味。无明显沉淀和分层。

4.2 理化要求

应符合表 1 的规定。

表 1 理化要求

项 目	指 标
酶活力/(U/g)	≥ 1 500

4.3 卫生要求
应符合表 2 的规定。

表 2 卫生要求

项 目	指 标
重金属[以铅(Pb)计]/(mg/kg)	≤ 30
铅/(mg/kg)	≤ 5
砷/(mg/kg)	≤ 3
菌落总数/[CFU/mL(或 CFU/g)]	50×10^3
大肠菌群/[MPN/100 mL(或 MPN/100 g)]	3×10^3
沙门氏菌/(个/25 g)	不得检出
致泻大肠埃希氏菌/(个/25 g)	不得检出

4.4 净含量
见标签标注,允许差按国家质量监督检验检疫总局[2005]第 75 号令执行。

5 试验方法

5.1 外观
取样品 10 mL(或 10 g)倒入 25 mL 的小烧杯中嗅闻其气味,再目视检查其外观,作出判断并做好记录。

5.2 酶活力
按附录 A 或附录 B 方法测定。以附录 A 所述方法为仲裁法。

5.3 重金属
按 GB/T 5009.74 测定。

5.4 铅
按 GB/T 5009.75 测定。

5.5 砷
按 GB/T 5009.76 测定。

5.6 菌落总数
按 GB/T 4789.2 检验。

5.7 大肠菌群
按 GB/T 4789.3 检验。

5.8 沙门氏菌
按 GB/T 4789.4 检验。

5.9 致泻大肠埃希氏菌
按 GB/T 4789.6 检验。

5.10 净含量
按 JJF 1070 检验。

6 检验规则

6.1 组批

以每一个发酵批次生产或最终同处于一个加工贮罐、品质均一旦经包装出厂(或入库)的产品为一批。

6.2 抽样

抽样时,应采用适宜的方法以保证具有代表性,保证取样部位和取样瓶的清洁。对用于微生物检验的取样,应使用无菌操作。

成品抽样的样本量见表 3。灌装过程中取样的样本量可按照估计的批量参照表 3 执行,或由生产企业和(或)相关方确定。

表 3 抽 样 量

批量/瓶(或件)	样本量/瓶(或件)
≤ 150	3
151~1 200	5
1 201~35 000	8
> 35 000	13

6.3 出厂检验

每批产品出厂时,应对其外观、酶活力、微生物指标、净含量及包装标签等进行逐项检验。

6.4 型式检验

正常生产时,至少每年对产品检验一次。如有下列情况之一者,亦应按本标准全部要求进行检验:

- 正常生产时,如原料、配方或工艺有较大改变,可能影响产品质量时;
- 更换设备,或产品长期停产又恢复生产时;
- 出厂检验结果与平常记录有较大差别时;
- 国家质量监督部门提出要求时。

6.5 判定规则

出厂检验和(或)型式检验合格时,由质量检验部门出具产品合格证。

出厂检验和(或)型式检验不合格时,在原批次基础上加倍抽取样品进行复验。如复验仍不合格,则判该批产品为不合格。

7 标志、包装、运输和贮存

7.1 标志

产品的外包装宜使用符合 GB/T 191 要求的标志。

产品的内包装上应贴有牢固的标签。产品的标签的内容应符合卫生部[2002]第 26 号令第四章的要求。标识内容应包括产品名称、厂名、厂址、规格、配方或主要成分、生产日期、批号或代号、保质期、执行标准号和卫生许可证号等,并在标识上明确标示“食品添加剂”字样。

7.2 包装

产品的内包装应采用国家批准的、并符合相应食品包装用标准的材料。包装容器及内涂料应采用国家批准的、并符合相应食品包装用标准的材料。

7.3 运输

产品在运输过程中应轻拿轻放,严防雨淋和曝晒。运输工具应清洁、无毒、无污染。严禁与有毒、有害、有腐蚀性的物质混装混运。

7.4 贮存

产品应贮存在阴凉干燥的环境下。严禁与有毒、有害、有腐蚀性的物质同存。

7.5 保质期

产品的保质期具体见标签标注。产品在 10℃下的保质期应大于三个月。

附录 A

(规范性附录)

 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定 分光光度法

A.1 范围

本方法规定了 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定方法。

本方法适用于用分光光度计测定 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂中 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力。本方法不适用于啤酒和其他含醇产品中 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力的测定。

试样中 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)和(或)双乙酰的存在会使试验结果偏大。

乙偶姻在贮存时易形成二聚体,从而影响试验结果。但若遵循配制步骤中所述的措施去预防,本方法仍可使用。

A.2 原理

α -乙酰乳酸脱羧酶与底物 α -乙酰乳酸反应脱羧生成乙偶姻。乙偶姻在碱性条件下与萘酚和肌酸的混合物反应生成红色产物。通过在 522 nm 下测定溶液的吸光度,可以从乙偶姻标准曲线上得出反应生成的乙偶姻的量,进而计算出 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力。

A.3 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

A.3.1 MES(9.76 g/L)-氯化钠(35.064 g/L)-聚氧化乙烯十二烷基醚¹⁾(1.52 mL/L)缓冲液

- 分别称取 2-[N-吗啉代]乙基磺酸(2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, MES)48.80 g 和氯化钠 175.32 g 于烧杯中,用约 4.5 L 水溶解,然后加入 15% 的聚氧化乙烯十二烷基醚溶液 7.60 mL,搅拌均匀。
- 用约 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 到 6.00 ± 0.05 。然后移入 5 000 mL 容量瓶中,用水定容,搅拌均匀。

该溶液在常温(15℃~20℃)下的保存期为一周。

A.3.2 α -乙酰乳酸底物(2.00 mL/L)

- 吸取乙基-2-乙酰基-2-甲基乙酰乙酸(ethyl-2-acetoxy-2-methylacetoacetate)100 μ L 于 50 mL 容量瓶中,加入约 0.50 mol/L 的氢氧化钠溶液 6.0 mL,搅拌 20 min 后,加入缓冲液(A.3.1)到约 40.0 mL。
 - 用约 1 mol/L 盐酸调节溶液的 pH 到 6.00 ± 0.05 。然后,再用缓冲液(A.3.1)定容。
- 该溶液使用前配制。

A.3.3 萘酚(10.0 g/L)/肌酸(1.0 g/L)显色剂

分别称取 1-萘酚 5.0 g 和肌酸 0.5 g 移入 500 mL 容量瓶中,用约 1 mol/L 的氢氧化钠溶液溶解并定容。

该溶液使用前配制。配制时需避光,并且冰浴。

注意:1-萘酚可燃,有毒。对眼和粘膜有刺激性。吞咽或经皮肤吸收都能引起中毒。

A.3.4 乙偶姻(3-羟基-2-丁酮)储备液(1.000 g/L)

- 取一定量的乙偶姻于试管中,在 37℃ 恒温箱中溶解。然后将试管置于冰水中使乙偶姻重结

1) Brij[®] 35 是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对这一产品的认可。

晶。重结晶后,乙偶姻不含有影响试验结果的乙偶姻二聚体,可用于储备液的配制。

b) 称取重结晶后的乙偶姻 0.100 g,精确至 0.000 1 g,移入 100 mL 容量瓶中,用水溶解并定容。

乙偶姻对热不稳定,且容易吸潮,因此应放置在干燥器中冷藏($2^{\circ}\text{C}\sim 6^{\circ}\text{C}$)保存。如发现物质有明显的吸潮现象,建议放弃不用。

该溶液在冷藏条件下的保存期为一周。

A.3.5 乙偶姻标准溶液

乙偶姻标准溶液,用乙偶姻储备液(A.3.4)和水按照表 A.1 稀释而成,该溶液应每天配制。

表 A.1 乙偶姻标准溶液

标准点	乙偶姻储备液/ mL	水/ mL	稀释倍数	乙偶姻/ (mg/L)
1		100.0	—	0 ^a
2	1.0	99.0	100.0	10.0
3	2.0	98.0	50.0	20.0
4	4.0	96.0	25.0	40.0
5	6.0	94.0	16.7	60.0
6	8.0	92.0	12.5	80.0
^a 用水做第一个标准点。				

A.4 仪器

A.4.1 分析天平:精度为 0.000 1 g。

A.4.2 酸度计:精度为 0.01pH 单位。

A.4.3 恒温水浴锅: $30^{\circ}\text{C}\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 。

A.4.4 分光光度计:可在 522 nm 下测定吸光度。

A.4.5 计时器。

A.4.6 漩涡振荡器。

A.5 分析步骤

A.5.1 乙偶姻标准曲线的制备

分别吸取配制好的乙偶姻标准溶液 400 μL (见表 A.1)到 10 mL 的试管中。然后,依次在每个试管中加入显色剂(A.3.3)4.60 mL,用漩涡振荡器充分混合均匀。置于室温,并开始计时。

反应 40.0 min 后,使用分光光度计,在 522 nm 下测定各管溶液的吸光度。

A.5.2 标准对照品的制备

建议使用一个有代表性的、稳定的样品作为标准对照品。

在每次分析中,将该标准对照品与样品一同进行检测,以判断试验的重复性。

A.5.3 样品溶液的制备

从样品中称取一定量的试料,精确至 0.000 5 g,用溶液(A.3.1)稀释。其稀释的倍数要使得样品的最终吸光度 H_1 落在乙偶姻标准曲线的范围内。

A.5.4 酶样品的反应

将试料溶液和底物先置于 30°C 水浴中预热约 10 min,然后,按下述方法处理每一个试料溶液:

a) 样品值 H_1 :吸取酶样品溶液 200.0 μL 于 $30^{\circ}\text{C}\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 水浴中的 10 mL 试管里,然后加入预热的底物 200.0 μL ,用漩涡振荡器充分混匀,迅速放回到水浴中,并开始计时。

b) 空白值 H_2 :用缓冲液(A. 3. 1)代替试料溶液,依上述步骤进行操作。

反应 20. 0 min 后,依次向每支试管中加入显色剂 4. 60 mL(A. 3. 3),用漩涡震荡器充分混匀。置于室温,重新开始计时。

反应 40. 0 min 后,使用分光光度计,在 522 nm 波长下测定各管溶液的吸光度。

A. 6 结果的计算和表示

A. 6. 1 标准曲线

以 522 nm 波长下的吸光度为 Y 轴,乙偶姻的浓度(mg/L)为 X 轴,绘制标准曲线,计算出标准曲线的斜率 h (或用回归方程计算)。

A. 6. 2 样品酶活力的计算

样品的酶活力按式(A. 1)计算:

$$U = \frac{(H_1 - H_2) \times 0.001\,135\,1 \times F}{m \times h} \dots\dots\dots (A. 1)$$

式中:

U ——样品的酶活力,单位为酶活力单位每克(U/g);

H_1 ——样品的吸光度;

H_2 ——空白的吸光度;

0. 001 135 1——0. 1 g 的乙偶姻所对应的摩尔数;

F ——样品溶液反应前的总稀释倍数;

m ——试料的质量,单位为克(g);

h ——标准曲线的斜率。

A. 6. 3 结果的表示

样品的测定结果用算术平均值表示。

当结果小于 1 U/g(或 1 U/mL)时给出一位有效数字;当结果大于等于 1 U/g(或 1 U/mL)且小于 100 U/g(或 100 U/mL)时给出两位有效数字;当结果大于等于 100 U/g(或 100 U/mL)时给出三位有效数字。

A. 6. 4 重复性

在重复性条件下获得的两次单独测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 10%,以大于这两个测定值的算术平均值的 10%的情况不超过 5%为前提。

附录 B

(规范性附录)

 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定 全自动生化分析仪法

B.1 范围

本方法规定了 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定方法。

本方法适用于用全自动生化分析仪测定 α -乙酰乳酸脱羧酶制剂中 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力。本方法不适用于啤酒和其他含醇产品中 α -乙酰乳酸脱羧酶活力的测定。

本方法的检测限为 0.6 U/g 或 0.6 U/mL。

试样中 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)和(或)双乙酰的存在会使试验结果偏大。

乙偶姻在贮存时易形成二聚体,从而影响试验结果。但若遵循配制步骤中所述的措施去预防,本方法仍可使用。

B.2 原理

α -乙酰乳酸脱羧酶与底物 α -乙酰乳酸反应脱羧生成乙偶姻。乙偶姻在碱性条件下与萘酚和肌酸的混合物反应生成红色产物。通过在 510 nm 波长下测定标准溶液的吸光度绘制出标准曲线,对照标准曲线进一步计算出酶样品的活力。

B.3 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

B.3.1 MES(9.76 g/L)-氯化钠(35.064 g/L)-聚氧化乙烯十二烷基醚(1.52 mL/L)缓冲液

见 A.3.1。

B.3.2 α -乙酰乳酸底物(2.00 mL/L)

见 A.3.2。

B.3.3 萘酚(10.0 g/L)/肌酸(1.0 g/L)显色剂

见 A.3.3。

B.4 仪器

B.4.1 全自动生化分析仪:要求带有进样系统、搅拌系统、温度控制系统($30^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$)和检测系统。检测系统要求可在 510 nm 波长处,用动力学法检测吸光度变化,时间间隔最少 18 s。

如:Konelab 30 或同等分析效果的仪器。

B.4.2 分析天平:精度为 0.000 1 g。

B.4.3 酸度计:精度为 0.01pH 单位。

B.5 分析步骤

B.5.1 标准曲线的制备

称取一定量的 α -乙酰乳酸脱羧酶标准品,精确到 0.000 5 g。用缓冲液(B.3.1)溶解并定容至 100 mL,得到标准储备液。标准品称取的量要使标准储备液中 α -乙酰乳酸脱羧酶的酶活力约为 0.75 U/mL。

然后,按照表 B.1 配制标准曲线。

表 B.1 α-乙酰乳酸脱羧酶标准曲线

标准点	标准储备液/ μL	缓冲液(B.3.1)/ μL	稀释倍数	稀释后活性/ (mU/mL)
1	—	600.0	—	0.0 ^a
2	20.0	580.0	30.0	25.0
3	30.0	570.0	20.0	37.5
4	40.0	560.0	15.0	50.0
5	50.0	550.0	12.0	62.5
6	60.0	540.0	10.0	75.0
^a 用缓冲液 B.4.1 做标准点 1。				

标准储备液和标准曲线应每日配制。

B.5.2 标准对照品的制备

- a) 取一定量的乙偶姻于试管中,在 37℃ 的恒温箱中溶解。然后将试管置于冰水中使乙偶姻重结晶。
 - b) 称取 0.197 g 重结晶后的乙偶姻,精确到 0.000 1 g,用缓冲液(B.3.1)溶解并定容至200 mL,得到标准对照品储备液。然后再用相同的缓冲液稀释 20 倍备用。
- 二次稀释后的乙偶姻溶液的浓度相当于 50 mU/mL。
- 标准对照品储备液在 4℃~8℃并且避光的条件下的保存期为一周。

B.5.3 样品溶液的制备

从样品中称取一定量的试料,用缓冲液(B.3.1)溶解稀释。稀释的倍数要使得最终稀释液的酶活力在 27.5 mU/mL~62.5 mU/mL 范围内。

B.5.4 酶活力自动分析参考条件

B.5.4.1 底物保温周期

- 温度:30℃;
- 时间:480 s;
- 底物(B.3.2):40 μL;
- 水:20 μL。

B.5.4.2 酶反应周期

- 温度:30℃;
- 时间:650 s;
- 样品稀释液:40 μL;
- 水:20μL。

B.5.4.3 显色反应周期

- 温度:30℃;
- 时间:240 s;
- 显色试剂(B.3.3):80 μL;
- 水:15 μL。

B.5.4.4 测定周期

- 测定模式:动力学法;
- 波长:510 nm;
- 曲线类型:非线性;

时间:145 s;

读数:9 次;

间隔:18 s。

B.6 结果的计算和表示

B.6.1 标准曲线的计算

用参数 Logit-Log 法计算出标准曲线。其中 Y 轴单位为 OD/min, X 轴单位为标准点的酶活力 mU/mL。

B.6.2 样品酶活力的计算

从标准曲线上读出样品最终稀释液的酶活力,单位为 mU/mL。

然后,按照式(B.1)计算样品的酶活力:

$$U = \frac{A \times F \times D}{m \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

U——样品的酶活力,单位为酶活力单位每克(U/g)或酶活力单位每毫升(U/mL);

A——由标准曲线得出的样品最终稀释液的活性力,单位为毫酶活力单位每毫升(mU/mL);

F——溶解样品用的容量瓶的体积,单位为毫升(mL);

D——稀释倍数;

m——试料的质量的数值,单位为克(g);

1 000——mU 到 U 的单位转换因子。

B.6.3 结果的表示

当标准对照品稀释液的实验值在 0.48 mU/mL~0.52 mU/mL 时,样品的实验结果有效,可计算平均值。否则,应重新进行试验。

B.6.4 结果的表示

样品的测定结果用算术平均值表示。

当结果小于 1 U/g(或 1 U/mL)时给出一位有效数字;当结果大于等于 1 U/g(或 1 U/mL)且小于 100 U/g(或 100 U/mL)时给出两位有效数字;当结果大于等于 100 U/g(或 100 U/mL)时给出三位有效数字。当结果小于 0.6 U/g(或 0.6 U/mL)时,表示为<0.6 U/g(或 0.6 U/mL)。

B.6.5 重复性

在重复性条件下获得的两次单独测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 4%,以大于这两个测定值的算术平均值的 4%的情况不超过 5%为前提。