

中华人民共和国国家标准

GB/T 23881—2009

饲用纤维素酶活性的测定 滤纸法

Determination of feed cellulase activity—
Filter paper assay method

2009-05-26 发布

2009-10-01 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

前 言

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：国家饲料质量监督检验中心(武汉)。

本标准主要起草人：何凤琴、杨林、钱昉、刘小敏、屈利文、黄婷、颜克亮。

饲用纤维素酶活性的测定

滤纸法

1 范围

本标准规定了以滤纸为底物,用还原糖比色法测定饲用纤维素酶活性的方法。
本标准适用于饲用纤维素酶活性的测定,定量检测限为 0.02 U/mL。

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 6682 分析实验用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

滤纸纤维素酶活性单位 filter paper cellulase activity unit

在 37 °C, pH5.5, 反应 60 min 的条件下,每分钟降解滤纸释放 1 μmol 葡萄糖所需的酶量,定义为一个滤纸纤维素酶活性单位,以 U 表示。

4 原理

纤维素酶水解滤纸产生的纤维二糖、葡萄糖等还原糖能将碱性条件下的 3,5-二硝基水杨酸还原,生成棕红色的氨基化合物,在 540 nm 波长处有最大吸收,在一定范围内酶解产生的还原糖的量与反应液的吸光值成正比。

5 试剂和材料

本标准使用的试剂均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682 中规定的二级水。

5.1 酒石酸钾钠($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$)。

5.2 苯酚。

5.3 亚硫酸钠。

5.4 氢氧化钠溶液(200 g/L):称取氢氧化钠 20.0 g,加 100 mL 水溶解。

5.5 柠檬酸溶液(0.1 mol/L):称取柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)2.10 g,加水溶解定容至 100 mL。

5.6 柠檬酸钠溶液(0.1 mol/L):称取柠檬酸钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)2.94 g,加水溶解定容至 100 mL。

5.7 柠檬酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH5.5):称取柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)10.5 g,加入氢氧化钠 5.0 g,再加 800 mL 水溶解,用柠檬酸溶液(5.5)或柠檬酸钠溶液(5.6)调节 pH 至 5.5,再用水定容至 1 000 mL。

5.8 Whatman 1号滤纸条(1.0 cm×6.0 cm)。

5.9 DNS试剂:称取3,5-二硝基水杨酸3.15 g,加水500 mL搅拌溶解,水浴至45℃,然后逐步加入氢氧化钠溶液(5.4)100 mL,同时不断搅拌,直至完全溶解,再逐步加入酒石酸钾钠(5.1)91.0 g、苯酚(5.2)2.50 g和亚硫酸钠(5.3)2.50 g,搅拌至溶解,冷却到室温后,定容至1 000 mL。过滤,取滤液贮存于棕色瓶中,避光保存。室温下存放7 d后可以使用,有效期为6个月。

警告:处理酸碱和配制DNS试剂时,应在通风橱或通风良好的房间进行,戴上保护眼镜和乳胶手套,一旦皮肤或眼睛接触了上述物质,及时用大量的水冲洗。

5.10 葡萄糖标准溶液(10.0 mg/mL):称取经105℃烘至恒量的无水葡萄糖约1 g,精确至0.000 1 g,加柠檬酸盐缓冲液(5.7)溶解,定容至100 mL。

6 仪器与设备

除常用实验室设备外,其他仪器设备如下。

6.1 分样筛:孔径为0.25 mm(60目)。

6.2 分析天平:感量为0.000 1 g。

6.3 pH计:精确至0.01。

6.4 磁力搅拌器:附加加热功能。

6.5 电磁振荡器。

6.6 离心机。

6.7 恒温水浴锅。

6.8 秒表。

6.9 分光光度计。

6.10 移液器:精度为1 μL。

7 试样的制备

按GB/T 14699.1采样,按GB/T 20195选取样品至少500 g,四分法缩减至100 g,磨碎,通过0.25 mm孔筛,混匀密闭容器中,低温保存。

8 测定

8.1 试样溶液的准备

称取0.2 g~4 g试样,精确至0.000 1 g,加入40 mL柠檬酸盐缓冲液(5.7),磁力搅拌30 min,再用柠檬酸盐缓冲液(5.7)定容至100 mL,在4℃条件下避光保存24 h。摇匀,取30 mL~50 mL,以3 000 r/min离心3 min。取5.00 mL上清液,用柠檬酸盐缓冲液(5.7)做二次稀释(稀释后的待测酶液中纤维素酶活性应控制在0.04 U/mL~0.18 U/mL之间)。

液体样品可以直接用柠檬酸盐缓冲液(5.7)进行稀释,定容(稀释后的酶液中纤维素酶活性应控制在0.04 U/mL~0.18 U/mL之间)。如果稀释后的酶液pH偏离5.5,需重新调节pH为5.5,用柠檬酸盐缓冲液(5.7)稀释定容。

8.2 标准曲线

8.2.1 分别量取葡萄糖标准溶液(5.10)0.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、6.00 mL、8.00 mL、10.00 mL,分别用柠檬酸盐缓冲液(5.7)定容至50 mL,配成浓度为0.00 mg/mL~2.00 mg/mL的葡萄糖标准系列。

8.2.2 分别吸取葡萄糖标准溶液(8.2.1)各1.00 mL于25 mL容量瓶中,各加2.00 mL水和2.00 mL DNS试剂(5.9),沸水浴5 min。冷却至室温,用水定容至25 mL,在540 nm波长下比色,以吸光度作横坐标,对应标准葡萄糖溶液含糖的毫克数为纵坐标,列出直线回归方程。

8.3 酶活性的测定

8.3.1 吸取 10.0 mL 经过适当稀释的酶液(8.1), 37 °C 平衡 10 min。

8.3.2 在 25 mL 具塞比色管中加入滤纸条(5.8)——滤纸条须对称剪成 32 片并全部放入, 加 1.0 mL 柠檬酸盐缓冲液(5.7)浸润滤纸片, 37 °C 水浴平衡 10 min, 再依次加入 2.00 mL DNS 试剂(5.9), 0.50 mL 酶液(8.3.1), 5 mL 水, 电磁振荡 3 s~5 s, 37 °C 水浴中保温 60 min(用秒表控制), 然后在沸水浴中煮沸 5 min, 冷却至室温, 用水定容至 25 mL, 在 540 nm 波长处测定校准值 A_0 。

8.3.3 在 25 mL 具塞比色管中加入滤纸条(5.8)——滤纸条须对称剪成 32 片并全部放入, 加 1.0 mL 柠檬酸盐缓冲液(5.7)浸润滤纸片, 37 °C 水浴平衡 10 min, 再依次加入 0.50 mL 酶液(8.3.1), 5 mL 水, 电磁振荡 3 s~5 s, 37 °C 水浴中保温 60 min(用秒表控制), 加 2.00 mL DNS 试剂(5.9), 然后在沸水浴中煮沸 5 min, 冷却至室温, 用水定容至 25 mL。在 540 nm 波长处测定吸光度 A_1 。

9 结果计算

9.1 试样中滤纸纤维素酶活性以 X 表示, 单位为酶活性单位每克(U/g), 按式(1)计算:

$$X = \frac{m}{M \times t} \times 1\,000 \times n \quad \dots\dots\dots(1)$$

式(1)中:

X ——试样纤维素酶的活性, 单位为酶活性单位每克(U/g);

m ——根据标准曲线方程上计算得的($A_1 - A_0$)值对应的葡萄糖的质量, 单位为毫克(mg);

M ——葡萄糖的摩尔质量, 180.2 g/mol;

t ——酶解反应时间, 单位为分钟(min);

1 000——转化因子, 1 mmol=1 000 μ mol;

n ——试样的总稀释倍数。

9.2 每个试样取两份试料进行平行试验, 测定结果用其算术平均值表示, 保留 3 位有效数字。

10 重复性

在重复性条件下的两次测定, 所得结果的相对偏差不超过 20%。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲用纤维素酶活性的测定
滤纸法

GB/T 23881—2009

*

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 0.5 字数 7 千字

2009年8月第一版 2009年8月第一次印刷

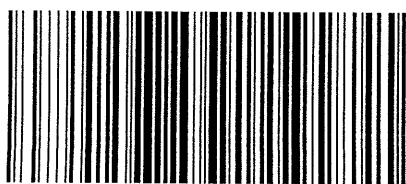
*

书号: 155066·1-38469 定价 14.00 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/T 23881—2009

打印日期: 2009年10月14日