



中华人民共和国国家标准

GB/T 18634—2009
代替 GB/T 18634—2002

饲用植酸酶活性的测定 分光光度法

Determination of feed phytase activity—
Spectrophotometric method

MACHINERY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

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 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准代替 GB/T 18634—2002《饲用植酸酶活性的测定 分光光度法》。

本标准与 GB/T 18634—2002 相比主要变化如下：

- 缩小了方法的适用范围；
- 改变了方法的最低定量限；
- 改变了缓冲溶液的配制方法；
- 细化了测定过程中的操作步骤；
- 删除了相对法；
- 扩大了添加植酸酶的配合饲料样品两次试验的允许差，相对偏差 $\leq 15\%$ 。

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准负责起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]，广东溢多利生物科技股份有限公司，武汉新华扬生物有限公司。

本标准主要起草人：马东霞、詹志春、史宝军、苏晓鸥、詹连生、梁雪霞、张苏。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18634—2002。

MACY 天析仪器
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

饲用植酸酶活性的测定

分光光度法

1 范围

本标准规定了以分光光度法测定饲用植酸酶的活性。

本标准适用于作为饲料添加剂使用的植酸酶产品,也适用于添加有植酸酶的配合饲料。方法最低定量限为 130 U/kg。

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 14699.1 饲料 采样

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

植酸酶活性 **phytase activity**

在温度 37 ℃、pH 5.50 条件下,每分钟从浓度为 5.0 mmol/L 植酸钠溶液中释放 1 μmol 无机磷,即为一个植酸酶活性单位,以 U 表示。

4 原理

植酸酶在一定温度和 pH 条件下,将底物植酸钠水解,生成正磷酸和肌醇衍生物。在酸性溶液中,能与钒钼酸铵生成黄色的复合物,可于波长 415 nm 下进行比色测定。

5 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。清洗试验用器皿不要用含磷清洗剂。

5.1 磷酸二氢钾(KH_2PO_4):基准物。

5.2 乙酸缓冲液(1), $c(\text{CH}_3\text{COONa})=0.25 \text{ mol/L}$:称取 20.52 g 无水乙酸钠于 1 000 mL 烧杯中,加入 900 mL 水搅拌溶解,用冰乙酸调节 pH 至 5.50 ± 0.01 ,再转移至 1 000 mL 容量瓶中,并用蒸馏水定容至刻度。室温下存放 2 个月内有效。

5.3 乙酸缓冲液(2), $c(\text{CH}_3\text{COONa})=0.25 \text{ mol/L}$:称取 20.52 g 无水乙酸钠,0.5 g 曲拉通 X-100 (Triton X-100),0.5 g 牛血清白蛋白(BSA)于 1 000 mL 烧杯中,加入 900 mL 水搅拌溶解,用冰乙酸调节 pH 至 5.50 ± 0.01 ,再转移至 1 000 mL 容量瓶中,并用蒸馏水定容至刻度。室温下存放 2 个月内有效。

5.4 底物溶液, $c(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_5\text{Na}_{12})=7.5 \text{ mmol/L}$:称取 0.69 g 植酸钠($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_5\text{Na}_{12}$,相对分子质量为 923.8,纯度为 95%),精确至 0.1 mg,置于 100 mL 烧杯中,用约 80 mL 乙酸缓冲液(5.2)溶解,用冰乙酸调节 pH 至 5.50 ± 0.01 ,转移至 100 mL 容量瓶中,并用乙酸缓冲液(5.2)定容至刻度,现用现配

(实际反应液中的最终浓度为 5.0 mmol/L)。

5.5 硝酸溶液:1+2 水溶液。

5.6 钼酸铵溶液,100 g/L:称取 10 g 钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 于 50 mL 烧杯中加水溶解,必要时可微加热,再转移至 100 mL 容量瓶中,加入 1.0 mL 氨水(25%)用水定容至刻度。

5.7 偏钒酸铵溶液,2.35 g/L:称取 0.235 g 偏钒酸铵 (NH_4VO_3) 于 50 mL 烧杯中,加入 2 mL 硝酸溶液(5.5)及少量水,并用玻璃棒研磨溶解,再转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用水定容至刻度。避光条件下保存一周内有效。

5.8 酶解反应终止及显色液:移取 2 份硝酸溶液(5.5),1 份钼酸铵溶液(5.6),1 份偏钒酸铵溶液(5.7)混合后使用,现用现配。

6 仪器和设备

实验室常用仪器设备及以下设备。

6.1 分析天平:感量 0.1 mg。

6.2 恒温水浴: $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$ 。

6.3 分光光度计:有 10 mm 比色皿,可在 415 nm 下测定吸光度。

6.4 磁力搅拌器。

6.5 涡流式混合器。

6.6 酸度计:pH 精确至 0.01。

6.7 离心机:转速为 4 000 r/min 以上。

6.8 超声波溶解器。

6.9 回旋式振荡器。

7 试样制备

7.1 固体样品

按 GB/T 14699.1 的规定进行采样,选取有代表性样品,用四分法将试样缩分至 100 g,植酸酶产品不需粉碎,配合饲料需粉碎通过 0.45 mm 标准筛,装入密封容器,防止试样成分变化。

7.2 液体样品

按 GB/T 14699.1 的规定进行采样,选取有代表性样品用前摇匀。

8 测定步骤

8.1 标准曲线

准确称取 0.680 4 g 在 105 $^\circ\text{C}$ 烘至恒重的基准磷酸二氢钾(5.1)于 100 mL 容量瓶中,用乙酸缓冲液(5.2)溶解,并定容至刻度,浓度为 50.0 mmol/L。按表 1 的比例用乙酸缓冲液(5.3)稀释成不同浓度,与待测试样一起反应测定。以无机磷的量为横坐标,吸光值为纵坐标,列出直线回归方程($y = a + bx$)。

表 1 标准稀释比例

标准溶液序号	稀释量/mL	浓度/ $(\mu\text{mol/mL})$
1	0.5→16	1.562 5
2	0.5→8	3.125 0
3	0.5→4	6.250 0
4	0.5→2	12.500
5	0.5→1	25.000

8.2 试样溶液的制备

8.2.1 酶制剂样品中酶的提取

参照附录 A 中建议的称样量称取植酸酶试样两份,精确至 0.000 1 g,置于 100 mL 容量瓶中,加入乙酸缓冲液(5.3)摇匀并定容至刻度。放入一个磁力棒,在磁力搅拌器(6.4)上高速搅拌 30 min。或在超声波溶解器(6.8)上超声溶解 15 min,再放入回旋式振荡器(6.9)中振荡 30 min。

8.2.2 加酶饲料样品中酶的提取

称取添加植酸酶的饲料试样两份,精确至 0.000 1 g,置于 200 mL 刻度锥形瓶中,加入乙酸缓冲液(5.3)100.0 mL。在超声波溶解器(6.8)上超声溶解 15 min,再放入回旋式振荡器(6.9)中振荡 30 min。

所有提取后的试样必要时在离心机(6.7)上以 4 000 r/min 离心 10 min。分取不同体积的上清液用乙酸缓冲液(5.3)稀释,使试样溶液的浓度保持在 0.4 U/mL 左右,待反应。

建议在测定样品时附加一个已知活性的植酸酶参考样,便于检验整个操作过程是否有偏差。

8.3 反应

取 10 mL 试管按下面的反应顺序进行操作,标准空白加入 0.2 mL 乙酸缓冲液(5.3)。在反应过程中,从加入底物溶液(5.4)开始,向每支试管中加入试剂的时间间隔要一致,在恒温水浴(6.2)中 37 °C 水解 30 min。

反应步骤及试剂、溶液用量见表 2。

表 2 反应步骤及试剂、溶液用量

反应顺序	样品、标准	样品空白
1. 加乙酸缓冲液(5.3)	1.8 mL	1.8 mL
2. 加入待反应液	0.2 mL	0.2 mL
3. 混合	✓	✓
4. 水浴(6.2)中 37 °C 预热 5 min	✓	✓
5. 依次加入底物溶液(5.4)	4 mL	4 mL(第二步)
6. 混合	✓	✓
7. 水浴(6.2)中 37 °C 水解 30 min	✓	✓
8. 依次加入终止及显色液(5.8)	4 mL	4 mL(第一步)
9. 混合	✓	✓
总体积	10 mL	10 mL

8.4 样品测定

反应后的试样在室温下静置 10 min,如出现混浊需在离心机(6.7)上以 4 000 r/min 离心 10 min,上清液以标准曲线的空白调零,在分光光度计(6.3)415 nm 波长处测定试样空白(A₀)和试样溶液(A)的吸光值,A-A₀为实测吸光值。用直线回归方程计算植酸酶的活性。

9 结果计算和表示

9.1 结果计算

试样中植酸酶活性以 X 表示,单位为酶活性单位每克(U/g)或酶活性单位每毫升(U/mL),按式(1)计算:

$$X = \frac{y}{m \times t} \times n \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X——试样中植酸酶的活性,单位为酶活性单位每克(U/g)或酶活性单位每毫升(U/mL);

y ——根据实际样液的吸光值由直线回归方程计算出的无机磷的量,单位为微摩尔(μmol);

t ——酶解反应时间,单位为分钟(min);

n ——试样的稀释倍数;

m ——试样的量,单位为克(g)或毫升(mL)。

9.2 结果表示

两个平行试样的测定结果用算术平均值表示,酶制剂样品保留整数,加酶饲料样品保留三位有效数字。

9.3 重复性

同一试样两个平行测定值的相对偏差,植酸酶产品不大于8%,添加植酸酶的各种饲料样品不大于15%。

 **美析仪器**
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

附 录 A
(资料性附录)
建议称样量

根据样品植酸酶活性的不同,建议称样量见表 A.1。

表 A.1 建议称样量

植酸酶活性/(U/g)	称样量/g
5 000 以上	0.1~1
1 000~5 000	0.2~1
500~1 000	1~2
1~500	2~5
0.13~1	5~10


美析仪器
 MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
 HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

MACY 美析仪器
MACY INSTRUMENT

专业光度计系列生产厂家
中华人民共和国
国家标准

饲用植酸酶活性的测定
分光光度法

HTTP://www.macylab.com TEL:400-810-4686

GB/T 18634—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 0.75 字数 9 千字
2009年8月第一版 2009年8月第一次印刷

*

书号: 155066·1-38459 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/T 18634-2009

打印日期: 2009年9月1日