



团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

葡萄糖氧化酶耐热性测定 水浴法

Determination of thermostability of glucose oxidase water bath method

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国畜牧业协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国畜牧业协会提出并归口。

本文件起草单位：武汉新华扬生物股份有限公司，湖北华扬科技发展有限公司，辽宁禾丰牧业股份有限公司，安佑生物科技集团股份有限公司，通威股份有限公司，广东温氏食品集团股份有限公司，山西大禹生物工程股份有限公司。

本文件起草人：詹志春，徐丽，周樱，王丽娟，洪翊棻，祝丹，谭会泽，张瑜，程瑛，徐杰，王改琴，吴昊，陈雪姣，闫凌鹏，苏丹，邓晓旭。

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及“附录A”与《一种快速测定葡萄糖氧化酶活力的方法》（ZL 201410409560.2）相关专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，在公平、合理、无歧视基础上，免费许可任何组织或者个人在实施该团体标准时实施专利。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：武汉新华扬生物股份有限公司。

地址：湖北省武汉市东湖新技术开发区光谷八路98号。

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

葡萄糖氧化酶耐热性测定 水浴法

1 范围

本文件规定了以水浴法测定葡萄糖氧化酶的耐热性，适用于测定酶蛋白的耐热性。
本文件适用于耐热型葡萄糖氧化酶产品，适用于固态及液态产品。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

葡萄糖氧化酶活性单位 Glucose oxidase activity unit

在温度37°C，pH 6.0的条件下，1 min催化 β -D-葡萄糖氧化产生出1 μ mol过氧化氢所需的酶量，即为1个酶活力单位，以U表示。

3.2

酶活性存留率 enzyme activity retention rate

未经热处理酶活性为初始酶活性，经高温处理后为处理后酶活性，处理后酶活性与初始酶活性的比值为酶活性存留率。

4 原理

将葡萄糖氧化酶试样稀释至一定浓度，通过试管在恒温水浴锅中高温处理，检测试样在高温条件下的酶活性变化，测定葡萄糖氧化酶的耐温酶活性存留率。

5 试剂或材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，三级。

5.2 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液：称取 15.605 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，加水溶解并定容至 1 L。

5.3 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液：称取 35.82 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，加水溶解并定容至 1 L。

5.4 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.0）：分别取 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液 877 mL，0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液 123 mL 混和成磷酸盐缓冲液，再用 0.1 mol/L 的磷酸氢二钠溶液或 0.1 mol/L 的磷酸二氢钠溶液调节 pH 至 6.0。

6 仪器设备

6.1 分析天平：精度 0.000 1 g。

6.2 pH 计：精确至 0.01。

- 6.3 恒温振荡器：精确至 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.4 恒温水浴锅：精确至 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ，带循环水泵。
- 6.5 秒表：每小时误差不超过 5 s。
- 6.6 离心机：转速 4000 r/min 以上。

7 试验步骤

7.1 样品制备

7.1.1 固态样品

平行做2份试验。称取0.2~1 g 试样，精确至0.0001 g，置于锥形瓶中，加入100 mL磷酸盐缓冲液(5.4)，置于25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器中提取30 min，室温静止10 min，离心或过滤，取上清液或滤液，使用磷酸盐缓冲液(5.4)进行稀释，将葡萄糖氧化酶活性控制为2~20 U/mL，作为待处理酶稀释液。

7.1.2 液态样品

平行做2份试验。移取0.2~1 mL试样，使用磷酸盐缓冲液(5.4)进行稀释，将葡萄糖氧化酶活性控制为2~20 U/mL，作为待处理酶稀释液。

7.2 初始酶活性的检测

参考附录A，检测以上待处理酶稀释液的初始酶活，记为U。

7.3 水浴法处理

取5 mL 待处理酶稀释液于10 mL带盖玻璃试管($\phi 15 \times 100$ mm，保持试管一致性)中，置于(75 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 、85 $^{\circ}\text{C}$ 、90 $^{\circ}\text{C}$)水浴锅(水浴锅开孔位 $\phi 60$ mm，水浴锅水位加至边沿下2 cm处)中，精确计时5 min，立即取出放入冰水浴中，冷却至室温。

参考附录A，检测热处理后酶活性，记为 U_1 。

8 试验数据处理

8.1 结果计算

酶活性存留率按式(1)计算：

$$K = \frac{U_1}{U} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- K —酶活性存留率，%；
 U —初始酶活性；
 U_1 —高温处理后酶活性。

8.2 结果表示

平行试样的测定结果用算术平均值表示，计算结果小数点后保留两位有效数字。

9 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大于这两个测定值的算术平均值的10%。

附录 A
(资料性)
葡萄糖氧化酶活性测定方法

A.1 原理

在葡萄糖氧化酶的作用下，葡萄糖和氧反应，生成葡萄糖酸和过氧化氢，过氧化氢和无色的还原型邻联茴香胺在过氧化物酶的作用下，生成水和棕色的氧化型邻联茴香胺，棕色的氧化型邻联茴香胺与硫酸溶液反应变为粉红色，可于波长540 nm处比色测定。

A.2 试剂和材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

A.2.1 水：GB/T 6682，三级。**A.2.2 0.1 mol/L磷酸缓冲液（pH 6.0）**

甲液 0.1 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ：称取15.605 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，加水溶解并定容至1 L。

乙液 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ：称取35.82 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，加水溶解并定容至1 L。

取877 mL 甲液与123 mL 乙液混合成磷酸盐缓冲液，再用0.1 mol/L 的磷酸氢二钠溶液或0.1 mol/L 的磷酸二氢钠溶液调节pH至6.0。

A.2.3 1% 邻联茴香胺甲醇储存液：称取0.1 g邻联茴香胺（分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ ，分子量244.29），于10 mL 甲醇中避光搅拌溶解，移至棕色瓶中。于4°C密封保存，有效期为30 d。**A.2.4 180 g/L 葡萄糖溶液：称取D-无水葡萄糖18 g（纯度99.5%），溶于100 mL 蒸馏水中。于4°C保存，有效期为3 d。****A.2.5 辣根过氧化物酶溶液（100 U/mL）：根据标注酶活力，用水配制成100 U/mL 辣根过氧化物酶溶液。注意在冷水中配制，于-20°C中冷冻保存，有效期60 d。****A.2.6 邻联茴香胺缓冲液：取0.1 mL 1%邻联茴香胺甲醇储存液（A.2.3）加入到12 mL 磷酸盐缓冲液（A.2.2）中混匀，现用现配。****A.2.7 2 mol/L H_2SO_4 溶液：将27.1 mL 浓硫酸（98%）溶于250 mL 蒸馏水中。****A.2.8 2400 mg/L 过氧化氢标准溶液：准确称取0.800 g 30%过氧化氢溶液（过氧化氢溶液需预先用 K_2MnO_4 标定），加蒸馏水定容于100 mL。现配现用。****A.3 仪器设备****A.3.1 分光光度计：波长准确度 ± 1 nm，可在540 nm 处比色。****A.3.2 分析天平：精度0.000 1 g。****A.3.3 pH计：精确至0.01。****A.3.4 涡旋混合器。****A.3.5 恒温振荡器：精确至 $\pm 1.0^\circ\text{C}$ 。****A.3.6 恒温水浴锅：精确至 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ，带循环水泵。****A.3.7 秒表：每小时误差不超过5 s。****A.3.8 离心机：转速4000 r/min 以上。****A.4 标准曲线绘制**

吸取过氧化氢标准溶液（A.2.8）0 mL、0.3 mL、0.5 mL、0.7 mL、0.8 mL、0.9 mL 和1.1 mL，分别用磷酸盐缓冲液（A.2.2）定容至25 mL，配成终浓度为0 μg/mL、28.8 μg/mL、48 μg/mL、67.2 μg/mL、76.8 μg/mL、86.4 μg/mL 和105.6 μg/mL 的过氧化氢标准系列溶液。

取10 mL 试管（每个浓度两个平行），依次加入2.5 mL 邻联茴香胺缓冲液（A.2.6）、0.3 mL 葡萄糖溶液（A.2.4）、0.1 mL 过氧化物酶溶液（A.2.5），涡旋混合器混匀后再加入0.1 mL 上述过氧化氢标准系列溶液。混匀，加入2 mL 2 mol/L 的硫酸溶液（A.2.7），以含0 μg/mL过氧化氢的试管为标准空白溶液，在540 nm 处比色。以吸光值为横坐标，过氧化氢浓度为纵坐标绘制过氧化氢标准曲线。

A.5 样品制备

平行做2份试验。称取0.2~1 g 固体试样，精确至0.0001 g，置于锥形瓶中，加入100 mL磷酸盐缓冲液（A.2.2），置于25°C恒温振荡器中提取30 min，室温静止10 min，离心或过滤，再用磷酸缓冲液（A.2.2）稀释至适当倍数，控制酶浓度在0.6~0.9 U/mL之间，对应净吸光值范围为0.25~0.35。

平行做2份试验。移取0.2~1 mL液体试样，用磷酸盐缓冲液（A.2.2）稀释至适当倍数，控制酶浓度在0.6~0.9 U/mL 之间，对应净吸光值范围为0.25~0.35。

A.6 试验步骤

在试管中依次加入2.5 mL 邻联茴香胺缓冲液（A.2.6）、0.3 mL 葡萄糖溶液（A.2.4）、0.1 mL 过氧化物酶溶液（A.2.5），涡旋混合器振荡均匀，于37°C恒温水浴锅中预热5 min，测定管中加入待测葡萄糖氧化酶溶液0.1 mL，37°C精确反应3 min，加入2 mol/L 的硫酸溶液（A.2.7）2 mL，振荡摇匀，终止反应，冷却至室温。在540 nm 处比色，以标准空白溶液为空白对照，净吸光值记为A。

A.7 试验数据处理

试样中葡萄糖氧化酶活性以 X 表示，数值以酶活性单位每克或酶活性单位每毫升(U/g 或 U/mL)表示，按式（2）计算：

$$X = \frac{A \times K + C_0}{T \times m \times 34.01} \times N \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X — 试样中的葡萄糖氧化酶活性，U/g（或U/mL）；

A — 酶反应组的净吸光度；

K — 标准曲线的斜率；

C_0 — 标准曲线的截距；

N — 试样的总稀释倍数；

m — 称样量，g或mL；

T — 反应时间3 min；

34.01—过氧化氢的分子量。

A.8 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大于这两个测定值的算术平均值的10%。