



中华人民共和国国家标准

GB/T 35808—2018

林业生物质原料分析方法 纤维素酶活性测定

Method for analysis of forestry biomass—Determination of cellulase activity

2018-02-06 发布

2018-09-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家林业局提出。

本标准由全国林业生物质材料标准化技术委员会(SAC/TC 416)归口。

本标准起草单位:北京林业大学、厦门标普标准化服务有限公司。

本标准主要起草人:赵宏飞、张柏林、常建民、周方、任学勇、许金飞。

林业生物质原料分析方法

纤维素酶活性测定

1 范围

本标准规定了在给定条件下与纤维素酶活性测定方法有关的术语和定义、原理、试剂和材料、仪器与设备、标准曲线绘制、试样制备、测定步骤、结果计算、重复性要求、试验报告。

本标准适用于林业生物质原料分析用纤维素酶活性的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验用水规格和试验方法

GB/T 30366—2013 生物质术语

3 术语和定义

GB/T 30366—2013 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用,以下重复列出了 GB/T 30366—2013 中的一些术语和定义。

3.1

林业生物质 forestry biomass

林业生产和加工过程中产生的生物质。主要包括林产品(如木材、竹材、藤材等)、林业剩余物(如枝丫、锯末、木屑、梢头、板皮和截头、果壳和果核等采伐剩余物和加工剩余物、造纸废弃物以及废弃木材)、能源林等。

[GB/T 30366—2013,定义 2.1.3]

3.2

纤维素酶活力单位 cellulase activity unit

在 37 ℃,pH5.5 的条件下,每分钟从浓度为 5 g/L 的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液中释放出相当于 1 μmol 葡萄糖的还原糖量,为一个酶活力单位(U)。

4 原理

纤维素酶在一定温度和 pH 条件下,水解羧甲基纤维素产生的纤维二糖、葡萄糖等还原糖能将碱性条件下的 3,5-二硝基水杨酸(DNS)还原,生成棕红色的氨基化合物,在 540 nm 波长处有最大光吸收,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,利用比色法测定还原糖生成量就可以计算纤维素酶的活力。

5 试剂和材料

5.1 本标准所使用所有的试剂若无特殊说明,均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682 中规定的二级水。

- 5.2 氢氧化钠溶液(200 g/L):称取氢氧化钠 20.0 g,加水溶解,定容至 100 mL。
- 5.3 葡萄糖标准贮备溶液制备(10 mg/mL):称取于 105 °C ± 2 °C 下烘干至恒重的无水葡萄糖 1 g,精确至 0.1 mg,用水溶解并定容至 100 mL。
- 5.4 柠檬酸溶液(0.1 mol/L):称取水柠檬酸 21.01 g,加水溶解定容至 1 000 mL。
- 5.5 柠檬酸钠溶液(0.1 mol/L):称取二水柠檬酸钠 29.41 g,加水溶解定容至 1 000 mL。
- 5.6 柠檬酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH5.5):称取水柠檬酸 10.5 g,加入氢氧化钠 5.0 g,溶于约 800 mL 水中,用柠檬酸溶液(5.4)或柠檬酸钠溶液(5.5)调节 pH 至 5.5,再用水定容至 1 000 mL。
- 5.7 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液(5 g/L):称取羧甲基纤维素钠(Sigma-C5678)0.50 g,加入柠檬酸盐缓冲液(5.6)80 mL,磁力搅拌,同时缓慢加热,直至羧甲基纤维素钠全部溶解,然后停止加热,继续搅拌 30 min,用柠檬酸盐缓冲液(5.6)定容至 100 mL。羧甲基纤维素钠溶液能立即使用,4 °C 避光处放置,有效期为 3 d。
- 5.8 3,5-二硝基水杨酸试剂:称取 3,5-二硝基水杨酸(DNS)3.15 g,置于约 500 mL 水中,在 50 °C 水浴中搅拌溶解,逐渐加入氢氧化钠溶液 100 mL,再依次加入酒石酸钾钠 91.0 g、苯酚 2.5 g 和无水亚硫酸钠 2.5 g,待全部溶解并澄清后,冷却至室温,用水定容至 1 000 mL,过滤。贮存于棕色试剂瓶中,避光处放置 7 d 后使用,有效期为 6 个月。

6 仪器与设备

- 6.1 分析天平:感量为 0.000 1 g。
- 6.2 pH 计:精确至 0.01。
- 6.3 磁力搅拌器:附加加热功能。
- 6.4 电磁振荡器。
- 6.5 离心机。
- 6.6 恒温水浴锅。
- 6.7 秒表:每小时误差不超过 5 s。
- 6.8 分光光度计。
- 6.9 移液器:精确度为 1 μ L。
- 6.10 植物粉碎机:配有 2 mm 筛孔的植物粉碎机。
- 6.11 分样筛:孔径为 0.25 mm(60 目)。

7 标准曲线绘制

分别吸取葡萄糖标准贮备溶液 0.00 mL、2.00 mL、4.00 mL、6.00 mL、8.00 mL、10.00 mL、12.00 mL、14.00 mL,分别用柠檬酸盐缓冲液定容至 100 mL,配制成浓度为 0.00 mg/mL~1.4 mg/mL 的葡萄糖标准溶液。

分别吸取葡萄糖标准溶液各 1.00 mL 于刻度试管中,各加 2.00 mL 水和 2.00 mL DNS 试剂。置于沸水浴中煮沸 5 min。取出,迅速冷却至室温,用水定容至 25 mL,在波长 540 nm 处测量吸光度值。以标准葡萄糖溶液含糖的毫克数为横坐标,以对应吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,获得线性回归方程。

8 试样制备

固体样品用植物粉碎机粉碎,然后过 0.25 mm(60 目)筛,称取试样 2 份,精确至 0.000 1 g,加入 40 mL 柠檬酸盐缓冲液,磁力搅拌 30 min,再用柠檬酸盐缓冲液定容至 100 mL,4 °C 避光放置 24 h。摇匀,取 30 mL~50 mL,以 3 000 r/min 离心 3 min,取上清液备用。

液体样品直接用柠檬酸盐缓冲液进行稀释定容。

9 测定步骤

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

吸取 10.0 mL 经过羧甲基纤维素钠溶液, 37 °C 平衡 10 min。

在 25 mL 刻度具塞试管中, 准确加入 1.00 mL 羧甲基纤维素钠溶液(5.7), 再依次加入 2.00 mL DNS 试剂, 0.5 mL 酶液, 5 mL 水, 电磁振荡 3 s, 置于 37 °C 水浴中, 准确计时, 反应 60 min, 然后放入沸水浴中加热 5 min, 冷却至室温, 用水定容至 25 mL。540 nm 波长处测量吸光度 A_0 。

在 25 mL 刻度具塞试管中, 准确加入 1.00 mL 羧甲基纤维素钠溶液, 再依次加入 0.5 mL 酶液, 5 mL 水, 电磁振荡 3 s, 置于 37 °C 水浴中, 准确计时, 反应 60 min, 加 2.00 mL DNS 试剂, 然后放入沸水浴中加热 5 min, 冷却至室温, 用水定容至 25 mL。540 nm 波长处测量吸光度 A_1 。

10 结果计算

试样纤维素酶活力按下列公式计算:

$$X = \frac{m}{M \times t} \times 1\,000 \times n$$

式中:

X —— 纤维素酶活力, 单位为酶活力单位每克(U/g)或酶活力单位每毫升(U/mL);

m —— 根据标准曲线方程计算出($A_1 - A_0$)值对应的葡萄糖质量, 单位为毫克(mg);

M —— 葡萄糖摩尔质量, 180.2 g/mol;

t —— 酶解反应时间, 单位为分(min);

1 000 —— 转化因子, 1 mmol = 1 000 μ mol;

n —— 试样的总稀释倍数。

酶活力计算结果表示到小数点后三位。

11 重复性

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。同一试样两个平行测定值的相对偏差不超过 20%。

12 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容:

- 样品信息: 试验或测试样品的名称、种类、尺寸、数量、取样信息等;
- 所使用的标准(包括发布或出版年号);
- 所使用的试验方法;
- 结果;
- 观察到的异常现象;
- 试验人员、日期。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
林业生物质原料分析方法
纤维素酶活性测定
GB/T 35808—2018

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2018年2月第一版

*

书号: 155066 · 1-58980

版权专有 侵权必究



GB/T 35808-2018