

团 体 标 准

T/CIFST 008—2022

乳中乳过氧化物酶活性的测定 比色法

Determination of the lactoperoxidase activity in milk—
Colorimetric method

2022-04-22 发布

2022-04-22 实施

中国食品科学技术学会 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。

本文件的某些内容可能涉及专利，发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：光明乳业股份有限公司、上海市农产品质量安全中心、北京中检葆泰生物技术有限公司、内蒙古伊利实业集团股份有限公司。

本文件主要起草人：郭慧媛、张锋华、丰东升、刘龙飞、李志君、花榜清、王霞、赵婷婷、赵欣。

乳中乳过氧化物酶活性的测定

比色法

1 范围

本文件规定了乳中乳过氧化物酶活性测定的比色法。

本文件适用于生乳、巴氏杀菌乳中乳过氧化物酶活性的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

乳过氧化物酶活性单位 unit of lactoperoxidase activity

在温度 20 °C ~ 30 °C、pH 6.5 ~ 7.2 条件下，每分钟催化氧化 1 μmol 底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 所需要的乳过氧化物酶的量表述为 1 个乳过氧化物酶活性单位，即 1U。

4 原理

乳中乳过氧化物酶与底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 发生氧化反应，生成蓝色产物，加酸终止反应后溶液变成黄色。在 450 nm 下测定溶液的吸光度，乳过氧化物酶的活性与吸光度成正比，通过标准曲线定量计算其酶活性。

5 试剂和材料

5.1 乳过氧化物酶活性测定所用试剂。或使用 Evergreen 乳过氧化物酶活性试剂盒测定，试剂盒组成见附录 A¹⁾。

5.1.1 乳过氧化物酶标准溶液：来源于菌落总数小于 1.0×10^5 CFU/mL、体细胞数小于 7.5×10^5 个/mL 的生乳，酶活性 ≥ 1600 U/L。

5.1.2 检测稀释液：含 5% 乙酸和 100 g/L 脱脂乳粉的溶液。

5.1.3 样品处理溶液：10% ~ 30% 乙酸溶液。

5.1.4 乳过氧化物酶底物：7.2 mg/L 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液。

1) 给出该信息是为了方便本文件使用者。如果其它产品的操作步骤有不同，需经试验评估后采用。

5.1.5 终止液:0.18 mol/L 硫酸溶液。

注:除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 标准溶液制备

5.2.1 分别取 6 个 1 mL 离心管,标记为 1~6,分别加入 150 μ L 检测稀释液。

5.2.2 准确吸取 150 μ L 乳过氧化物酶标准溶液,置 1 号管中,混合,此管乳过氧化物酶活性为 800 U/L。至少静置 15 s 后进行下一步稀释。

5.2.3 准确吸取 1 号管中标准溶液 150 μ L,置 2 号管中,混合,此管乳过氧化物酶活性为 400 U/L。至少静置 15 s 后进行下一步稀释操作。

5.2.4 按照上述 5.2.3 方法,逐级稀释 4 次,分别得到乳过氧化物酶活性为 200 U/L、100 U/L、50 U/L 和 25 U/L 的系列标准溶液,如表 1 所示。检测稀释液的乳过氧化物酶活性为 0 U/L。

表 1 系列标准溶液稀释表

离心管编号	标准溶液(μ L)	检测稀释液(μ L)	乳过氧化物酶活性(U/L)
1	150	150	800
2	150(取自 1 号管)	150	400
3	150(取自 2 号管)	150	200
4	150(取自 3 号管)	150	100
5	150(取自 4 号管)	150	50
6	150(取自 5 号管)	150	25

5.3 材料

5.3.1 滤纸:直径 11.5 cm。

5.3.2 微孔板:共 96 个微孔(12 \times 8 孔/条)。

6 仪器和设备

6.1 酶标仪:装载 450 nm 滤光片。

6.2 天平:感量为 0.001 g。

6.3 离心机: $\geq 3000 \times g$ 。

6.4 振荡器:振荡频率 ≥ 100 次/min。

6.5 移液器及枪头:10~1000 μ L。

6.6 多道移液器:50~300 μ L。

6.7 离心管:1mL,15mL。

7 样品制备与保存

7.1 样品制备

7.1.1 生乳:采集 500 mL 生乳,搅拌均匀后作为样品待用。

7.1.2 巴氏杀菌乳:取 500 mL 巴氏杀菌乳,搅拌均匀后作为样品待用。

7.2 样品保存

样品从运输至检测前全程冷藏(0~6℃)运输储存,样品到达后于 2 h 内完成检测。

8 分析步骤

8.1 样品提取

吸取 10.00 mL 样品,置于 15 mL 离心管中,加入 0.6 mL 样品处理溶液,涡旋混匀,静置 5~10 min,3000 g 离心 10 min,用滤纸过滤,收集滤液待测。

8.2 测定

取出所需数量的微孔板,并做好标记。吸取 50 μL 滤液(8.1)和系列标准溶液分别加至微孔中,加入 50 μL 乳过氧化物酶底物溶液(TMB),吹打混匀,室温避光孵育 15 min。孵育结束后,向每个微孔中加入 100 μL 终止液,吹打混匀后,立即用酶标仪在 450 nm 下读取并记录每个微孔的吸光度(OD 值)。

样品中乳过氧化物酶活性可用检测稀释液稀释至标准曲线范围内,一般生乳应稀释 20~100 倍,巴氏杀菌乳应稀释 1~40 倍。

每次测定样品和标准溶液至少做双平行。

9 结果计算与表述

以乳过氧化物酶标准溶液的酶活性为横坐标,系列标准溶液对应的平均 OD 值为纵坐标,以四参数法绘制标准曲线,参见附录 A 中 A.2。从标准曲线上得到相应的乳过氧化物酶活性(y)后,样品中乳过氧化物酶活性结果按式(1)计算:

$$A = y \times 1.06 \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A ——样品中乳过氧化物酶的活性,单位为 U/L;

y ——标准曲线中获得的样品中乳过氧化物酶活性,单位为 U/L;

f ——样品的稀释倍数;

1.06——系数:总体积(10 mL+0.6 mL)/取样体积 10 mL。

计算结果取整数。

10 精密度和检出限

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的 10%。

当取样量为 10 mL 时,乳过氧化物酶活性的方法检出限为 25 U/L。

附录 A

(规范性)

Evergreen 乳过氧化物酶活性检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

Evergreen 乳过氧化物酶活性检测试剂盒包括：

- a) 微孔板：共 96 个微孔(12×8 孔/条)；
- b) 乳过氧化物酶标准品：来源于菌落总数小于 1.0×10^5 CFU/mL、体细胞数小于 750 000 个/mL 的生鲜乳，2 mL，1600 U/L；
- c) 检测稀释液：含 5% 乙酸和 100g/L 脱脂乳粉的溶液，50 mL；
- d) 乳过氧化物酶底物：7.2 mg/L 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液，6 mL；
- e) 终止液：0.18 mol/L 硫酸，12 mL；
- f) 样品处理溶液：10%~30% 乙酸溶液，60 mL。

A.2 标准曲线谱图

标准曲线谱图示例见图 A.1(根据本标准提供的计算方法或者软件绘制标准曲线)。

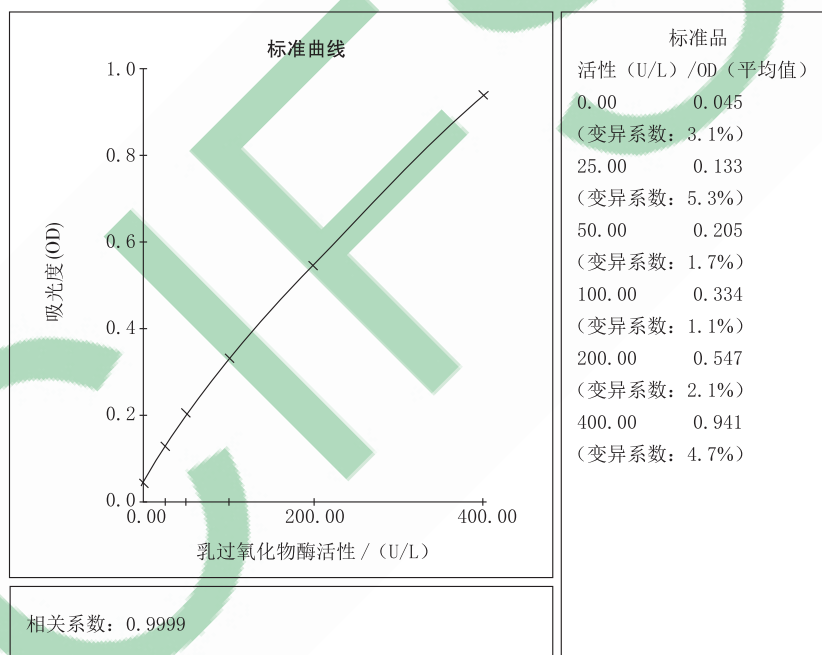


图 A.1 标准曲线谱图示例

A.3 试剂盒保存和注意事项

- A.3.1 试剂盒于 2℃~8℃ 避光保存，使用前恢复至室温。
- A.3.2 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- A.3.3 超过有效期的试剂盒不得使用。