



中华人民共和国国家标准

GB/T 28715—2012

饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定 分光光度法

Determination of acidic and neutral protease activity in feed additives—
Spectrophotometric method

2012-09-03 发布

2013-02-01 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。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:农业部农产品及转基因产品质量安全监督检验测试中心(杭州)、浙江大学饲料科学研究所、武汉新华扬生物有限公司。

本标准主要起草人:王小骊、柳爱春、邹晓庭、吴琪、赵芸、朱加虹、陈小丽、周樱、谢红云。

饲料添加剂酸性、中性蛋白酶活力的测定

分光光度法

1 范围

本标准规定了饲料添加剂酸性和中性蛋白酶活力的测定方法。

本标准适用于饲料添加剂酸性、中性蛋白酶产品中酶活力的测定,以及复合酶产品中中性蛋白酶活力的测定。

本标准定量限为 500 U/g(U/mL)。

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

酸性、中性蛋白酶活力单位 acidic and neutral protease active unit

在一定温度($40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$)和相应的 pH 条件下(酸性蛋白酶 pH3.0,中性蛋白酶 pH7.2),在 1 min 内水解酪蛋白产生相当于 $1\text{ }\mu\text{g}$ 酚基氨基酸(由酪氨酸等同物表示)的酶量,为 1 个酶活单位,以 U 表示。

4 原理

蛋白酶在一定的温度和 pH 条件下,水解酪蛋白底物产生含有酚基的氨基酸(如:酪氨酸、色氨酸),在碱性条件下,可将福林试剂(Folin)还原,生成钼蓝与钨蓝,其颜色的深浅与酚基氨基酸含量成正比。通过在 680 nm 测定其吸光度,得到酶解产生的酚基氨基酸的量,进而计算蛋白酶活力。

5 试剂和材料

除非另有说明,在分析中使用的试剂均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

5.1 碳酸钠溶液 [$c(\text{Na}_2\text{CO}_3)=0.4\text{ mol/L}$]

称取无水碳酸钠(Na_2CO_3)42.4 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。

5.2 三氯乙酸溶液 [$c(\text{CCl}_3\text{—COOH})=0.4\text{ mol/L}$]

称取三氯乙酸 65.4 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。

5.3 盐酸溶液 $[c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}]$

取浓盐酸 85 mL,加水稀释并定容至 1 000 mL,即为 1 mol/L 盐酸溶液。

5.4 盐酸溶液 $[c(\text{HCl}) = 0.1 \text{ mol/L}]$

取 100 mL 1 mol/L 盐酸溶液(5.3),定容至 1 000 mL,即为 0.1 mol/L 盐酸溶液。

5.5 氢氧化钠溶液 $[c(\text{NaOH}) = 0.5 \text{ mol/L}]$

取氢氧化钠 20 g,加水稀释并定容至 1 000 mL,即为 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液。

5.6 福林(Folin)试剂

于 2 000 mL 磨口回流装置中加入钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)100.0 g、钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)25.0 g、水 700 mL、85%磷酸 50 mL、浓盐酸 100 mL。小火沸腾回流 10 h,取下回流冷却器,在通风橱中加入硫酸锂(Li_2SO_4)50 g,水 50 mL 和数滴浓溴水(99%),再煮沸 15 min,以除去多余的溴(冷却后仍有绿色需再加溴水,再煮沸除去过量的溴),冷却后加水定容至 1 000 mL。混匀、过滤。试剂应呈金黄色,贮存于棕色瓶内。使用时,以 1 份福林(Folin)试剂与 2 份水混匀,制成稀福林(Folin)试剂。

5.7 乳酸缓冲液(pH3.0,适用于酸性蛋白酶)

甲液:称取 10.6 g 乳酸(85%~90%),加水稀释并定容至 1 000 mL。

乙液:称取 16 g 乳酸钠(70%),加水稀释并定容至 1 000 mL。

使用溶液:取 4 份甲液,加乙液(约 1 份)调整 pH 至 3.0 ± 0.05 ,此溶液在 4 °C 冰箱贮存,有效期为 3 d。

5.8 磷酸缓冲液(pH7.2,适用于中性蛋白酶)

分别称取磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)2.34 g 和磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)1.00 g,用水溶解,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.4)或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(5.5),单向调整 pH 至 7.2 ± 0.05 ,并定容至 1 000 mL,备用。

5.9 1%酪蛋白溶液

5.9.1 1%酸性酪蛋白溶液(pH3.0)

准确称取酪蛋白¹⁾1.000 g,先用约 0.5 mL 浓乳酸湿润后,再加入乳酸缓冲液(5.7)约 80 mL,在沸水浴中或磁力搅拌器上边加热边搅拌直至完全溶解,冷却后,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.4)或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(5.5),单向调整 pH 至 3.0 ± 0.05 ,并转入 100 mL 容量瓶中,用乳酸缓冲液(5.7)定容至刻度。此溶液在 4 °C 冰箱贮存,有效期为 3 d。

5.9.2 1%中性酪蛋白溶液(pH7.2)

准确称取酪蛋白¹⁾1.000 g,先用约 0.5 mL 氢氧化钠溶液(5.5)湿润后,再加入磷酸缓冲液(5.8)约 80 mL,在沸水浴中或磁力搅拌器上边加热边搅拌直至完全溶解,冷却后,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.4)或 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液(5.5),单向调整 pH 至 7.2 ± 0.05 ,并转入 100 mL 容量瓶中,用磷酸缓冲液(5.8)定容至刻度。其余同 5.9.1。

1) 标准使用的酪蛋白由中国药品生物制品检定所提供。给出这一信息是为了给使用者提供一个相对标准,如果其他产品能有相同的效果,则可以使用等效产品。

5.10 L-酪氨酸标准物质

纯度 $\geq 95\%$ 。

5.11 L-酪氨酸标准储备溶液

精确称取预先于 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的L-酪氨酸标准物质 0.1000 g ，用 20 mL 1 mol/L 盐酸溶液(5.3)溶解后，再用蒸馏水定容至 100 mL ，即为 1 mg/mL L-酪氨酸标准储备溶液。

5.12 L-酪氨酸标准溶液

临用前，准确吸取 10.0 mL 1 mg/mL 酪氨酸标准储备溶液(5.11)，用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.4)定容至 100 mL ，即得到 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ L-酪氨酸标准溶液。

6 仪器与设备

除常用实验室仪器设备外，应有下述仪器设备：

- 6.1 分光光度计：波长范围 $350\text{ nm}\sim 800\text{ nm}$ 。
- 6.2 pH计：精度为 0.01 pH 单位。
- 6.3 分析天平：感量 0.0001 g 和 0.01 g 。
- 6.4 恒温振荡水浴锅(或普通水浴锅)：精度为 $\pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.5 秒表或定时钟。

7 分析步骤

7.1 标准曲线绘制

分别准确吸取 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ L-酪氨酸标准溶液 0.00 mL 、 1.00 mL 、 2.00 mL 、 3.00 mL 、 4.00 mL 、 5.00 mL 和 6.00 mL 于 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，制成每毫升分别含L-酪氨酸 $0.0\text{ }\mu\text{g}$ 、 $10.0\text{ }\mu\text{g}$ 、 $20.0\text{ }\mu\text{g}$ 、 $30.0\text{ }\mu\text{g}$ 、 $40.0\text{ }\mu\text{g}$ 、 $50.0\text{ }\mu\text{g}$ 和 $60.0\text{ }\mu\text{g}$ 的标准工作溶液。

分别吸取L-酪氨酸标准工作溶液 1.0 mL ，加 5.0 mL 碳酸钠溶液(5.1)和 1.0 mL 稀福林(Folin)试剂(5.6)，于具塞试管中(每个浓度做2个平行)，混匀。

将标准管同时置于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴，反应 20 min ，取出，置于冷水中，迅速冷却至室温，用 10 mm 比色皿，以空白管调仪器零点，在分光光度计波长 680 nm 处测吸光度。以L-酪氨酸含量为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，获得线性回归方程。回归系数(r^2)在 0.9978 以上时，方可使用，否则应重做。

新配制的福林(Folin)试剂应制作新的标准曲线。

7.2 试样制备

7.2.1 液体酶试样的制备

根据样品酶活力大小，吸取适量的液体酶液，酸性蛋白酶试样用乳酸缓冲液(5.7)[中性蛋白酶试样则用磷酸缓冲液(5.8)]稀释至酶活力约为 $5\text{ U/mL}\sim 20\text{ U/mL}$ ，待测。

7.2.2 固体酶试样的制备

将试样粉碎或充分碾碎，过孔径为 0.25 mm 筛。根据样品酶活大小，称取 $0.2\text{ g}\sim 2\text{ g}$ 样品，精确至

0.001 g,置于 250 mL 锥形瓶中,酸性蛋白酶试样准确加入 100 mL 乳酸缓冲液(5.7)[中性蛋白酶试样则加入磷酸缓冲液(5.8)],搅拌使试样充分混匀,30 ℃ 100 r/min 振荡水浴(或用普通水浴锅,每 5 min 搅拌 1 次),水浴提取 30 min,摇匀,用中速定性滤纸过滤。滤液用乳酸缓冲液(5.7)[中性蛋白酶试样则用磷酸缓冲液(5.8)],稀释至酶活力约为 5 U/mL~20 U/mL,推荐的样品第二次稀释倍数见表 1。

表 1 推荐样品第二次稀释的倍数

样品酶活/(U/mL 或 U/g)	≤5 000	5 000~50 000	50 000~100 000	≥100 000
稀释倍数	1	10	20	50

7.3 测定步骤

取三支 10 mL 具塞试管(一支样品空白管,两支样品管),分别向三支试管中准确加入稀释好的待测酶液各 1.0 mL,将试管放入 40 ℃±0.2 ℃水浴中预热 5 min,向两支样品管中加入 1.0 mL 经同样预热的 1%酪蛋白溶液(5.9),准确计时反应 10 min,迅速、准确地向三支试管中加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸溶液(5.2),于样品空白管中加入 1.0 mL 1%酪蛋白溶液(5.9),摇匀。将三支试管继续置 40 ℃±0.2 ℃水浴中放置 10 min,取出,迅速冷却至室温,并用中速定性滤纸过滤。

另取三支 10 mL 具塞试管(一支样品空白管,两支样品管),分别吸取上述相应的滤出液 1.0 mL 加入三支试管中,各加入 5.0 mL 0.4 mol/L 碳酸钠溶液(5.1)、1.0 mL 稀福林(Foilyn)试剂(5.6),摇匀,水浴 40 ℃±0.2 ℃中放置 20 min,取出置于冷水中,迅速冷却至室温。

用水代替滤液做试剂空白,以试剂空白管调仪器零点,在分光光度计波长 680 nm 下,用 10 mm 比色皿,分别测定样品空白管和样品管中样液的吸光度,将样品管与样品空白管吸光度之差取平均值,通过线性回归方程求出生成的酪氨酸的浓度。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

样品中酸性或中性蛋白酶活力以 X_i 表示,按式(1)计算:

$$X_i = \frac{(c - c_0) \times V \times 4 \times N}{1.0 \times m \times 10} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X_i ——蛋白酶活力,单位为酶活单位每克(U/g)或酶活单位每毫升(U/mL);
- c ——样品管的酪氨酸浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- c_0 ——样品空白管的酪氨酸浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V ——固体酶试样提取液的总体积或液体酶试样第一次稀释总体积,单位为毫升(mL);
- N ——样品提取液第二次稀释的倍数;
- 4 ——酶反应体系总体积,单位为毫升(mL);
- 1.0 ——参与反应的酶量,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量或体积,单位为克(g)或毫升(mL);
- 10 ——反应时间,单位为分钟(min)。

8.2 结果表示

以平行样的平均值为最终的酶活力测定值,计算结果保留整数位。

9 重复性

试样应至少取两份平行样进行重复测定,平行样的相对标准偏差不超过 10.0%。
