



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 36861—2018

## 饲料添加剂 $\beta$ -甘露聚糖酶活力的测定 分光光度法

Determination of activity of  $\beta$ -mannanase as feed additive—  
Spectrophotometric method

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施



国家市场监督管理总局 发布  
中国国家标准化管理委员会

## 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)提出并归口。

本标准起草单位：浙江大学饲料科学研究所、浙江明珠动物保健品有限公司。

本标准主要起草人：邹晓庭、吴琪、周樱、王小骊、祝春雷、刘国花、谢红云、王凤芹、蒋媛婧、方洛云。

# 饲料添加剂 $\beta$ -甘露聚糖酶活力的测定

## 分光光度法

### 1 范围

本标准规定了测定饲料添加剂  $\beta$ -甘露聚糖酶活力的分光光度方法。

本标准适用于饲料添加剂  $\beta$ -甘露聚糖酶及其复合酶，本方法的定量限为 10 U/g。

### 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

**$\beta$ -甘露聚糖酶活力单位**  $\beta$ -mannanase activity unit

在 37 °C、pH 为 5.5 的条件下，每分钟从浓度为 3 mg/mL 的甘露聚糖溶液中释放 1  $\mu$ mol 还原糖所需要的酶量为一个  $\beta$ -甘露聚糖酶活力单位(U)。

### 4 原理

$\beta$ -甘露聚糖酶能将甘露聚糖降解成寡糖和单糖。还原性寡糖和单糖在沸水浴中与 DNS 试剂发生显色反应。反应液颜色的深浅与酶解产生的还原糖量成正比，而还原糖的生成量又与反应液中  $\beta$ -甘露聚糖酶的活力成正比。通过分光光度计比色测定反应液的吸光度，计算出  $\beta$ -甘露聚糖酶的活力。

### 5 试剂或材料

除非另有说明，试剂均为分析纯。

5.1 水：符合 GB/T 6682 中二级水的规定。

5.2 氢氧化钠溶液(200 g/L)：称取 20.0 g 氢氧化钠，加水溶解，定容至 100 mL。

5.3 乙酸溶液(0.1 mol/L)：取冰乙酸 0.60 mL，加水稀释，定容至 100 mL。

5.4 乙酸钠溶液(0.1 mol/L)：称取 1.36 g 三水乙酸钠，加水溶解，定容至 100 mL。

5.5 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 5.5)：称取 23.14 g 三水乙酸钠，加入 1.70 mL 冰乙酸，再加水溶解，定容至 2 000 mL。测定溶液的 pH，如果 pH 偏离 5.5，用乙酸溶液(5.3)或乙酸钠溶液(5.4)调节至 5.5。

5.6 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂：称取 3,5-二硝基水杨酸(化学纯)3.15 g，加水 500 mL，45 °C 水浴中搅拌 5 s。然后缓慢加入 100 mL 氢氧化钠溶液(5.2)，不断搅拌，直到溶液清澈透明(在加入氢氧化钠过程中，溶液温度不要超过 48 °C)。再逐步加入 91.00 g 四水酒石酸钾钠、2.50 g 苯酚和 2.50 g 无水亚

硫酸钠。继续 45 ℃ 水浴加热, 补加水 300 mL, 不断搅拌, 直到完全溶解。冷却至室温后, 用水定容至 1 000 mL。过滤, 取滤液, 储存在棕色塑料瓶中, 避光保存。室温下存放 7 d 后使用, 有效期为 6 个月。

5.7 甘露聚糖溶液(6 mg/mL): 称取 0.600 g 甘露聚糖(Sigma G0753<sup>1)</sup>), 精确到 0.001 g, 加入 80 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(5.5), 磁力搅拌, 间断性加热, 直至甘露聚糖完全溶解, 停止加热, 继续搅拌 30 min, 用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(5.5)定容至 100 mL。4 ℃ 避光保存, 有效期为 3 d, 使用前应搅拌均匀。

5.8 D-甘露糖标准贮备溶液: 精确称取预先在 105 ℃ 干燥至恒重的 1.000 g D-甘露糖, 加乙酸-乙酸钠缓冲溶液(5.5)溶解, 定容至 100 mL, 得到 10.0 mg/mL D-甘露糖标准贮备溶液。

5.9 D-甘露糖标准系列溶液: 吸取 D-甘露糖标准贮备溶液(5.8)1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、5.00 mL、6.00 mL 和 7.00 mL, 分别置于 100 mL 容量瓶中, 用乙酸-乙酸钠缓冲液(5.5)定容, 摇匀, 配制成 D-甘露糖标准工作溶液, 浓度为 0.10 mg/mL、0.20 mg/mL、0.30 mg/mL、0.40 mg/mL、0.50 mg/mL、0.60 mg/mL、0.70 mg/mL。

## 6 仪器设备

- 6.1 分样筛: 孔径为 0.25 mm。
- 6.2 分析天平: 感量 0.1 mg。
- 6.3 pH 计: 精度为 ±0.01。
- 6.4 磁力搅拌器: 附加加热功能。
- 6.5 恒温水浴锅: 37 ℃。
- 6.6 秒表: 每小时误差不超过 5 s。
- 6.7 分光光度计: 吸光度 540 nm。
- 6.8 离心机: 离心力不低于为 2 000 g。

## 7 试验步骤

### 7.1 标准曲线绘制

吸取缓冲液(5.5)4.0 mL, 加入 DNS 试剂(5.6)5.0 mL, 沸水浴加热 5 min。用水冷却至室温, 用水定容至 25 mL, 制成试剂空白溶液。

分别吸取 D-甘露糖标准系列溶液(5.9)各 2 mL, 加入至 25 mL 刻度试管中(每个浓度做 2 个平行), 再分别加入 2 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液(5.5)和 5 mL DNS 试剂(5.6), 用手微振, 沸水浴加热 5 min, 取出, 迅速用水冷却至室温, 再用水定容至 25 mL。以试剂空白溶液调零, 在 540 nm 处测定吸光度(A 值)。以 D-甘露糖浓度为 Y 轴、吸光度 A 值为 X 轴, 绘制标准曲线, 获得线性回归方程。

每次新配制 DNS 试剂均需要重新绘制标准曲线。

### 7.2 试样酶液的制备

#### 7.2.1 固态样品

固态试样应粉碎或充分碾碎, 过 0.25 mm 孔径筛。称取适量试样两份, 精确至 0.000 1 g, 分别置于 200 mL 锥形瓶中, 加入 100 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(5.5)。摇床或磁力搅拌提取 30 min, 上离心机 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 上清液再用缓冲溶液(5.5)做二次稀释, 使稀释后的待测酶液中 β-甘露聚糖酶活力控制在 0.04 U/mL~0.08 U/mL 之间。

<sup>1)</sup> Sigma G0753 是商品名, 来源于角豆树种子的胚乳(槐豆胶), 给出这一信息是为了给本标准的使用者一个相对标准, 如果其他产品能有相同的效果, 则可使用等效产品。

## 7.2.2 液态样品

移取适量试样,用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(5.5)进行稀释、定容,稀释后的待测酶液中 $\beta$ -甘露聚糖酶活力控制在0.04 U/mL~0.08 U/mL之间。如果稀释后酶液的pH偏离5.5,应用乙酸溶液(5.3)或乙酸钠溶液(5.4)调整校正至5.5,再用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(5.5)适当稀释并定容。

## 7.3 测定

7.3.1 移取10.0 mL待测酶液,置于具塞试管内,37℃±0.2℃水浴10 min。

7.3.2 称取2 g(精确至0.01 g)甘露聚糖溶液(5.7),至25 mL刻度试管中,37℃±0.2℃水浴10 min,加入5 mL DNS试剂(5.6),振摇3 s,加入2 mL经过37℃±0.2℃平衡的待测酶液,振摇3 s,37℃±0.2℃保温30 min,沸水浴加热5 min,取出,迅速用水冷却至室温,加水定容至25 mL混匀。以试剂空白溶液调零,用10 mm比色皿,在540 nm处测定样品空白溶液吸光度( $A_0$ )。

7.3.3 称取2 g(精确至0.01 g)甘露聚糖溶液(5.7),加入到25 mL刻度试管中,37℃±0.2℃平衡10 min,加入2 mL经过适当稀释的酶液(已经过37℃±0.2℃平衡),振摇3 s,37℃±0.2℃精确保温30 min,加入5 mL DNS试剂(5.6),振荡混匀,沸水浴加热5 min,取出,迅速用水冷却至室温,加水定容至25 mL混匀。以试剂空白溶液为空白对照,在波长540 nm下,测定样品管中样液的吸光度( $A$ ),通过线性回归方程计算 $\beta$ -甘露聚糖酶的活力。

## 8 试验数据处理

试样稀释液中 $\beta$ -甘露聚糖酶活力以 $X_D$ 表示,单位为酶活力单位每毫升(U/mL),按式(1)计算:

$$X_D = \frac{(A - A_0) \times k + b}{30 \times M} \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- $A$  ——样品管的吸光度;
- $A_0$  ——样品空白管的吸光度;
- $k$  ——标准曲线的斜率;
- $b$  ——标准曲线的截距;
- $M$  ——D-甘露糖的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol)( $M=180.2$  g/mol);
- 30 ——酶解反应时间,单位为分(min);
- 1 000——单位换算系数。

$X_D$ 值应在0.04 U/mL~0.08 U/mL之间。如果不在这个范围内,应重新选择酶液的稀释度,再进行分析测定。

试样 $\beta$ -甘露聚糖酶的活力以 $X$ 表示,单位为酶活力单位每克(U/g)或者酶活力单位每毫升(U/mL),按式(2)计算:

$$X = X_D \times n \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- $X_D$  ——试样稀释液中 $\beta$ -甘露聚糖酶活力,单位为酶活力单位每毫升(U/mL);
  - $n$  ——试样的总稀释倍数。
- 计算结果保留三位有效数字。

## 9 精密度

在重复性条件下,两次独立测定结果绝对差值不超过其算术平均值的10%。

中华人民共和国  
国家标准  
饲料添加剂  $\beta$ -甘露聚糖酶活力的测定  
分光光度法  
GB/T 36861—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.net.cn](http://www.spc.net.cn)  
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238  
读者服务部:(010)68523946  
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

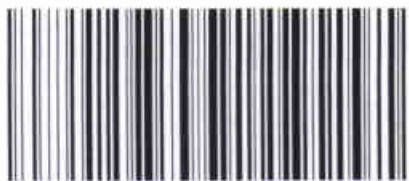
\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 9 千字  
2018年9月第一版 2018年9月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-61400 定价 14.00 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)68510107



GB/T 36861—2018