

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 912—2004

饲料添加剂 纤维素酶活力的测定 分光光度法

Determination of cellulase activity in feed additives
—Spectrothetic method

2005-01-04 发布

2005-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国农业大学农业部饲料工业中心、芬兰饲料国际有限公司、广东溢多利生物技术股份有限公司、辽宁众博饲料科技有限公司、北京中农博特生物工程技术有限公司、武汉新华扬生物有限公司。

本标准主要起草人：譙仕彦、陆文清、刘兴海、李德发、邢建军。

饲料添加剂 纤维素酶活力的测定 分光光度法

1 范围

本标准规定了用还原糖比色法测定饲料添加剂中纤维素酶的活力。

本标准适用于饲料添加剂用的饲料酶产品,也适用于含有纤维素酶的添加剂预混合饲料。样品的最低检出量为 1.0 U/g。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后的所有修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

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标准。

纤维素酶活力单位

在 37℃、pH 为 5.5 的条件下,每分钟从浓度为 4 mg/mL 的羧甲基纤维素钠溶液中降解释放 1 μmol 还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。

4 原理

纤维素酶能将羧甲基纤维素降解成寡糖和单糖。具有还原性末端的寡糖和有还原基团的单糖在沸水浴条件下可以与 DNS 试剂发生显色反应。反应液颜色的强度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纤维素酶的活力成正比。因此,通过分光比色测定反应液颜色的强度,可以计算反应液中纤维素酶的活力。

警告:在处理酸、碱和配制 DNS 试剂时,请戴上保护眼镜和乳胶手套,实验应在通风橱或通风良好的房间进行。一旦皮肤或眼睛接触了上述物质,应及时用大量的水冲洗。

5 试剂与溶液

除特殊说明外,所用的试剂均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682 中规定的二级水。

5.1 氢氧化钠溶液,浓度 $c(\text{NaOH})$ 为 200 g/L

称取氢氧化钠 20.0 g,加水溶解,定容至 100 mL。

5.2 乙酸溶液,浓度 $c(\text{CH}_3\text{COOH})$ 为 0.1 mol/L

吸取冰乙酸 0.60 mL,加水溶解,定容至 100 mL。

5.3 乙酸钠溶液,浓度 $c(\text{CH}_3\text{COONa})$ 为 0.1 mol/L

称取三水乙酸钠 1.36 g,加水溶解,定容至 100 mL。

5.4 乙酸—乙酸钠缓冲溶液,浓度 $c(\text{CH}_3\text{COOH—CH}_3\text{COONa})$ 为 0.1 mol/L, pH 为 5.5

称取三水乙酸钠 23.14 g,加入冰乙酸 1.70 mL。再加水溶解,定容至 2 000 mL。测定溶液的 pH。如果 pH 偏离 5.5,再用乙酸溶液(5.2)或乙酸钠溶液(5.3)调节至 5.5。

5.5 葡萄糖溶液,浓度 $c(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)$ 为 10.0 mg/mL

称取无水葡萄糖 1.000 g,加乙酸—乙酸钠缓冲液(5.4)溶解,定容至 100 mL。

5.6 羧甲基纤维素钠溶液,浓度为 8.0 g/L

称取羧甲基纤维素钠(Sigma C5678)0.80 g,加入 80 mL 乙酸—乙酸钠缓冲溶液(5.4)。磁力搅拌,同时缓慢加热,直至羧甲基纤维素钠完全溶解(注:在搅拌加热的过程中,可以补加适量的缓冲液,但是溶液的总容积不能超过 100 mL)。然后,停止加热,继续搅拌 30 min,用乙酸—乙酸钠缓冲溶液(5.4)定容至 100 mL。羧甲基纤维素钠溶液能立即使用,使用前适当摇匀。4℃ 避光保存,有效期为 3 d。

5.7 DNS 试剂

称取 3,5-二硝基水杨酸 3.15 g(化学纯),加水 500 mL,搅拌 5 s,水浴至 45℃。然后逐步加入 100 mL 氢氧化钠溶液(5.1),同时不断搅拌,直到溶液清澈透明(注意:在加入氢氧化钠过程中,溶液温度不要超过 48℃)。再逐步加入四水酒石酸钾钠 91.0 g、苯酚 2.50 g 和无水亚硫酸钠 2.50 g。继续 45℃ 水浴加热,同时补加水 300 mL,不断搅拌,直到加入的物质完全溶解。停止加热,冷却至室温后,用水定容至 1 000 mL。用烧结玻璃过滤器过滤。取滤液,储存在棕色瓶中,避光保存。室温下存放 7 d 后可以使用,有效期为 6 个月。

6 仪器与设备

6.1 实验室用样品粉碎机或碾钵。

6.2 分样筛

孔径为 0.25 mm(60 目)。

6.3 分析天平

感量 0.001 g。

6.4 pH 计

精确至 0.01。

6.5 磁力搅拌器

附加热功能。

6.6 电磁振荡器

6.7 烧结玻璃过滤器

孔径为 0.45 μm 。

6.8 离心机

3 000 r/min。

6.9 恒温水浴锅

温度控制范围在 30℃ ~ 60℃ 之间,精度为 0.1℃。

6.10 秒表

每小时误差不超过 5 s。

6.11 分光光度计

能检测 350 nm ~ 800 nm 的吸光度范围。

6.12 移液器

精度为 1 μL 。

6.13 冰箱

7 标准曲线的绘制

吸取缓冲液(5.4)4.0 mL,加入DNS试剂(5.7)5.0 mL,沸水浴加热5 min。用自来水冷却至室温,用水定容至25.0 mL,制成标准空白样。

分别吸取葡萄糖溶液(5.5)1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、5.00 mL、6.00 mL和7.00 mL,分别用缓冲液(5.4)定容至100 mL,配制成浓度为0.10 mg/mL~0.70 mg/mL葡萄糖标准溶液。

分别吸取上述浓度系列的葡萄糖标准溶液各2.00 mL(做2个平行),分别加入到刻度试管中,再分别加入2 mL水和5 mL DNS试剂(5.7)。电磁振荡3 s,沸水浴加热5 min。然后,用自来水冷却到室温,再用水定容至25 mL。以标准空白样为对照调零,在540 nm处测定吸光度OD值。

以葡萄糖浓度为Y轴、吸光度OD值为X轴,绘制标准曲线。每次新配制DNS试剂均需要重新绘制标准曲线。

8 试样溶液的制备

固体样品应粉碎或充分碾碎,然后过60目筛(孔径为0.25 mm),按照附录A中建议的称样量称取试样2份,精确至0.001 g。加入40 mL乙酸—乙酸钠缓冲溶液(5.4)。磁力搅拌30 min,再用缓冲溶液(5.4)定容至100 mL,在4℃条件下避光保存24 h。摇匀,取出30 mL~50 mL,上离心机离心3 min。吸取5.00 mL上清液,再用缓冲溶液(5.4)做二次稀释(稀释后的待测酶液中纤维素酶活力最好能控制在0.04 U/mL~0.08 U/mL之间)。

液体样品可以直接用乙酸—乙酸钠缓冲溶液(5.4)进行稀释、定容(稀释后的酶液中纤维素酶活力最好能控制在0.04 U/mL~0.08 U/mL之间)。如果稀释后酶液的pH偏离5.5,需要用乙酸溶液(5.2)或乙酸钠溶液(5.3)调节校正至5.5,然后再用缓冲溶液(5.4)做适当稀释定容。

9 测定步骤

吸取10.0 mL羧甲基纤维素钠溶液(5.6),37℃平衡10 min。

吸取10.0 mL经过适当稀释的酶液,37℃平衡10 min。

吸取2.00 mL经过适当稀释的酶液(已经过37℃平衡),加入到刻度试管中,再加入5 mL DNS试剂(5.7),电磁振荡3 s。然后加入2.0 mL羧甲基纤维素钠溶液(5.6),37℃保温30 min,沸水浴加热5 min。用自来水冷却至室温,加水定容至25 mL,电磁振荡3 s。以标准空白样(参见7)为空白对照,在540 nm处测定吸光度 A_B 。

吸取2.00 mL经过适当稀释的酶液(已经过37℃平衡),加入到刻度试管中,再加入2.0 mL羧甲基纤维素钠(5.6)(已经过37℃平衡),电磁振荡3 s,37℃精确保温30 min。加入5.0 mL DNS试剂(5.7),电磁振荡3 s,以终止酶解反应。沸水浴加热5 min,用自来水冷却至室温,加水定容至25 mL,电磁振荡3 s。以标准空白样(参见7)为空白对照,在540 nm处测定吸光度 A_E 。

10 试样酶活力的计算

试样纤维素酶活力按式(1)、式(2)计算。

$$X_D = \frac{[(A_E - A_B) \times K + C_0]}{M \times t} \times 1000 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X_D ——试样稀释液的纤维素酶活力,单位为酶活力单位每毫升(U/mL);

A_E ——酶反应液的吸光度;

A_B ——酶空白样的吸光度;

K ——标准曲线的斜率;

C_0 ——标准曲线的截距；

M ——葡萄糖的摩尔质量 $M(C_6H_{12}O_6) = 180.2 \text{ g/mol}$ ；

t ——酶解反应时间,单位为分钟(min)；

1 000 ——转化因子, $1 \text{ mmol} = 1\,000 \mu\text{mol}$

X_D 值应在 $0.04 \text{ U/mL} \sim 0.08 \text{ U/mL}$ 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。

$$X = X_D \times D_f \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样纤维素酶的活力,单位为酶活力单位每克(U/g)；

D_f ——试样的总稀释倍数。

酶活力的计算值保留 3 位有效数字。

11 重复性

同一试样两个平行测定值的相对误差不超过 8.0%,二者的平均值为最终的酶活力测定值(保留 3 位有效数字)。

附录 A
(资料性附录)
建议称样量

纤维素酶活力,U/g	称样量,g
>2 000	0.1~0.2
500~2 000	0.2~0.5
200~500	0.5~1.0
50~200	1.0~2.0
10~50	2.0~5.0
1~10	5.0~10.0