

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 911—2004

饲料添加剂 β -葡聚糖酶活力的测定 分光光度法

Determination of β -glucanase activity in feed additives
—Spectrothoetric 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。

本标准主要起草单位：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：陆文清、李德发、张丽英、朴香淑、邢建军、刘兴海。



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—乙酸钠缓冲溶液(5.4)溶解,定容至 100 mL。

5.6 β -葡聚糖溶液,浓度为 8.0 g/L。

称取 β -葡聚糖 0.40 g,加入乙醇 5.0 mL 润湿 β -葡聚糖,再加入 40 mL 乙酸—乙酸钠缓冲溶液(5.4)。磁力搅拌,同时缓慢加热,直至 β -葡聚糖完全溶解。(注:在搅拌加热的过程中,可以补加适量的缓冲液,但是溶液的总体积不能超过 50 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 50 mL。 β -葡聚糖溶液能立即使用,使用前适当摇匀。4℃ 避光保存,有效期为 3 d。

冷冻保存,有效期为 2 个月(使用前,在 4℃ 条件下解冻)。

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

吸取乙酸—乙酸钠缓冲溶液(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,分别用缓冲溶液(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2.0 mL缓冲液(5.4)和5.0 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。上离心机(6.8)离心3 min,取上清液,再用缓冲溶液(5.4)做适当稀释(稀释后的待测酶液中β-葡聚糖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 β-葡聚糖溶液(5.6),37℃平衡20 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 β-葡聚糖溶液(5.6),37℃平衡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 β-葡聚糖(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β-葡聚糖酶活力,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 ——试样中 β -葡聚糖酶的活力,单位为酶活力单位每克(U/g)；

D_f ——试样的稀释倍数。

酶活力的计算值保留 3 位有效数字。

11 重复性

每个试样应取 2 份平行样进行分析测定,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

β -葡聚糖酶活力,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