

ICS 67.220.20  
分类号: X69  
备案号: 12497-2003

**QB**

# 中华人民共和国轻工行业标准

QB 2583—2003

---

## 纤 维 素 酶 制 剂

**Cellulases**

2003-09-13 发布

2003-10-01 实施

---

中华人民共和国国家发展和改革委员会 发布

## 前 言

本标准的第 5.4 条为强制性的，其余为推荐性的。

本标准参考了联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会的食品添加剂标准纲要第一卷 [Compendium of Food Additive Specifications, Volume 1, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JECFA)] 食品工业用酶制剂通则中的“卫生指标”，其一致性程度为非等效。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为规范性附录，附录 D 为资料性附录。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国食品发酵标准化中心归口。

本标准起草单位：中国食品发酵工业研究院、北京宁馨儿生物科技开发有限公司、诺维信（中国）生物技术有限公司、中法合资唐山太博尔生物工程有限公司、中国科学院微生物研究所。

本标准主要起草人：张 蔚、焦志民、李忠兴、翟文景、赵 力、刘建军、崔福绵、田栖静。

本标准首次发布。

## 引 言

本标准是针对以木霉属为代表的微生物，经发酵、提取制得的纤维素酶制剂。它是一种纤维素酶复合物（纤维素酶系），在各种酶的协同作用下使纤维素降解，所以，统称为纤维素酶。一般来讲，纤维素酶中的多组分酶系包括外切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶（Exo  $\beta$ -1,4-glucanase, EC 3.2.1.91）、内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶（Endo  $\beta$ -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4）和纤维二糖酶（Cellobiase, EC 3.2.1.21）。不同来源的纤维素酶制剂产品中三种酶组分含量的比例不同，因此其最终的表现酶活力会有差异。

考虑到市场上的纤维素酶制剂品种繁多，等级不一，酶活力标示方法各不相同，故制定本标准，以统一国内纤维素酶的测定方法及使用单位，便于使用与交流。

产品分类中酸性纤维素酶、中性纤维素酶是按酶制剂在使用时的最适 pH 划分；而表 1 中的 pH 系指酶制剂终产品的 pH。

附录 A、B 所述方法，是通过测定纤维素酶降解底物生成的还原糖来反映纤维素酶的总酶活力；附录 C 所述方法，是以标准酶为对照，通过测定底物粘度的降低，得到纤维素酶的相对酶活力（侧重反映纤维素酶的内切酶活力）。生产者和使用者可根据产品的用途选择相应的试验方法。

由于天然纤维素的不溶性、底物结构的多样性，酶系组成、相关浓度和化学结构的不确定性，内切、外切酶的协同作用以及复杂的作用模式，各种终产物的不断形成及反馈控制等因素的影响，因此，若使方法获得较好的重现性和再现性，各实验室严格按照标准规定的底物、pH、反应时间与温度等条件操作是十分重要的。

本标准酶活力的测定，参考了 IUPAC、FCC、JECFA 推荐的方法以及国内外相关企业标准的测定方法，通过反复试验、验证修改而成。

# 纤维 素 酶 制 剂

## 1 范围

本标准规定了纤维素酶制剂的术语和定义、要求、试验方法、检验规则和标志、包装、运输、贮存。

本标准适用于以木霉属 (*Trichoderma*) 为代表的微生物及其变异株, 经液体深层发酵或固态培养后, 精制提纯制得的酸性(或中性)纤维素酶制剂。主要用于食品、纺织、造纸等工业。食品级纤维素酶制剂也可用作饲料添加剂。

## 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, 其随后所有的修改单(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 191 包装储运图示标志

GB/T 4789.2 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定

GB/T 4789.3 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定

GB/T 4789.4 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

GB/T 5009.11 食品中总砷的测定方法

GB/T 5009.12 食品中铅的测定方法

GB/T 8451 食品添加剂中重金属限量试验法

QB/T 1803—1993 工业酶制剂通用试验方法

QB/T 1804 工业酶制剂通用检验规则和标志、包装、运输、贮存

JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则

国家质量技术监督局[1995]第43号令 定量包装商品计量监督规定

## 3 术语、定义、符号、缩略语

下列术语、定义、符号、缩略语适用于本标准。

### 3.1

**纤维素酶 cellulases**

在各种酶组分的协同作用下, 能降解纤维素, 使之变成纤维寡糖、纤维二糖和葡萄糖的酶。

### 3.2

**滤纸酶活力 Filter paper activity (FPA)**

1g 固体酶(或 1mL 液体酶), 在 $(50 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 、指定 pH 条件下(酸性纤维素酶 pH4.8, 中性纤维素酶 pH6.0), 1h 水解滤纸底物, 产生出相当于 1mg 葡萄糖的还原糖量, 为 1 个酶活力单位, 以 u/g (或 u/mL) 表示。

### 3.3

**羧甲基纤维素酶活力 Sodium carboxymethylcellulose activity (CMCA)**

还原糖法 1g 固体酶(或 1mL 液体酶), 在 $(50 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 、指定 pH 条件下(酸性纤维素酶 pH4.8, 中性纤维素酶 pH6.0), 1h 水解羧甲基纤维素钠底物, 产生出相当于 1mg 葡萄糖的还原糖量, 为 1 个酶活力单位, 以 u/g (或 u/mL) 表示。简称为 CMCA-DNS。

粘度法 1g 固体酶(或 1mL 液体酶),在 $(40\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ 、指定 pH 条件下(酸性纤维素酶 pH6.0,中性纤维素酶 pH7.5),水解羧甲基纤维素钠底物,使底物粘度降低而得到的相对于标准品的纤维素酶相对酶活力。简称为 CMCA-VIS。

#### 4 产品分类

##### 4.1 按适用 pH

分为酸性纤维素酶和中性纤维素酶。

##### 4.2 按产品形态

分为固体酶制剂和液体酶制剂两种类型。

#### 5 要求

##### 5.1 净含量

按国家质量技术监督局[1995]第 43 号令执行。

##### 5.2 外观

固体剂型 浅灰色或浅黄色,粉状或颗粒状。无霉变、潮解、结块现象,无异味。易溶于水,溶解时允许有少量沉淀物。

液体剂型 棕色或褐色液体,无异味,允许有少量凝聚物。

##### 5.3 理化要求

理化指标应符合表 1 的规定。

表 1 纤维素酶的理化指标

项 目		液 体 剂 型		固 体 剂 型	
		食 品 级 <sup>a</sup>	工 业 级 <sup>b</sup>	食 品 级 <sup>a</sup>	工 业 级 <sup>b</sup>
总酶活力 <sup>c</sup> u/g (或 u/mL) ≥	FPA	300			
	CMCA-DNS	2 000			
	CMCA-VIS	500			
pH (25℃)		4.0~7.0		—	
<sup>a</sup> 食品级产品也可用作饲料添加剂。用作饲料添加剂的纤维素酶制剂还应符合其他相关标准法规的要求。 <sup>b</sup> 工业级产品不得用于食品工业及饲料添加剂(食用酒精和蒸馏酒类除外)。 <sup>c</sup> 可根据需要任意标注一种酶活。					

##### 5.4 卫生要求

卫生指标应符合表 2 的规定。

表 2 纤维素酶的卫生指标

项 目		液 体 剂 型		固 体 剂 型	
		食 品 级 <sup>a</sup>	工 业 级 <sup>b</sup>	食 品 级 <sup>a</sup>	工 业 级 <sup>b</sup>
重金属(以 Pb 计), mg/kg	≤	30	—	30	—
铅, mg/kg	≤	5	—	5	—
砷, mg/kg	≤	3	—	3	—
菌落总数, cfu/g	≤	$5\times 10^4$	—	$5\times 10^4$	—
大肠菌群, MPN/100g	≤	$3\times 10^3$	—	$3\times 10^3$	—
沙门氏菌(25g 样)		不得检出	—	不得检出	—
<sup>a, b</sup> 同表 1。					

## 5.5 保质期

5.5.1 在 25℃ 以下，固体酶制剂保质期不少于 180 d，保质期内酶活力应不低于标示的酶活力。

5.5.2 在 25℃ 以下，液体酶制剂保质期不少于 90 d，保质期内酶活力应不低于标示的酶活力。

## 6 试验方法

### 6.1 净含量

按 JJF 1070 执行。

### 6.2 外观

取样品 10 g（或 mL），观察、嗅闻，作出判断，做好记录。

### 6.3 酶活力

#### 6.3.1 滤纸酶活力，FPA

按附录 A 方法测定。

#### 6.3.2 羧甲基纤维素（还原糖法）酶活力，CMCA-DNS

按附录 B 方法测定。

#### 6.3.3 羧甲基纤维素（粘度法）酶活力，CMCA-VIS

按附录 C 方法测定。

### 6.4 pH

按 QB/T 1803—1993 第 9 章测定。

### 6.5 重金属

按 GB/T 8451 测定。

### 6.6 铅

按 GB/T 5009.12 测定。

### 6.7 砷

按 GB/T 5009.11 测定。

### 6.8 菌落总数

按 GB/T 4789.2 测定。

### 6.9 大肠菌群

按 GB/T 4789.3 测定。

### 6.10 沙门氏菌

按 GB/T 4789.4 检验。

## 7 检验规则和标志、包装、运输、贮存

7.1 包装储运图示标志按 GB/T 191 执行。

7.2 食品级纤维素酶制剂，应在标签（或质量证明）上标注“食品级”字样。

7.3 除上述提及条款外，均按 QB/T 1804 执行。

## 附录 A

(规范性附录)

## 滤纸酶活力(FPA)的测定方法

## A.1 原理

纤维素酶在一定温度和 pH 条件下,将纤维素底物(滤纸)水解,释放出还原糖。在碱性、煮沸条件下,3,5-二硝基水杨酸(DNS 试剂)与还原糖发生显色反应,其颜色的深浅与还原糖(以葡萄糖计)含量成正比。通过在 540nm 测其吸光度,可得到产生还原糖的量,计算出纤维素酶的滤纸酶活力。以此代表纤维素酶的酶活力。

## A.2 试剂和溶液

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

## A.2.1 DNS 试剂

称取 3,5-二硝基水杨酸( $10 \pm 0.1$ )g,置于约 600mL 水中,逐渐加入氢氧化钠 10g,在 50℃水浴中(磁力)搅拌溶解,再依次加入酒石酸甲钠 200g、苯酚(重蒸)2g 和 无水亚硫酸钠 5g,待全部溶解并澄清后,冷却至室温,用水定容至 1000mL,过滤。贮存于棕色试剂瓶中,于暗处放置 7d 后使用。

## A.2.2 柠檬酸缓冲液,0.05mol/L pH4.8 (适用于酸性纤维素酶)

称取一水柠檬酸 4.83g,溶于约 750mL 水中,在搅拌情况下,加入柠檬酸三钠 7.94g,用水定容至 1000mL。调节溶液的 pH 到 ( $4.8 \pm 0.05$ ) 备用。

注:也可采用 pH4.8 乙酸缓冲液:称取三水乙酸钠 8.16g,溶于约 750mL 水中,加入乙酸 2.31mL,用水定容至 1000mL。调节溶液的 pH 到 ( $4.8 \pm 0.05$ ) 备用。

## A.2.3 磷酸缓冲液,0.1mol/L pH6.0 (适用于中性纤维素酶)

分别称取一水磷酸二氢钠 121.0g 和二水磷酸氢二钠 21.89g,将其溶解在 10L 去离子水中。调节溶液的 pH 到 ( $6.0 \pm 0.05$ ) 备用。溶液在室温下可保存一个月。

## A.2.4 葡萄糖标准贮备溶液 (10mg/mL)

称取于 ( $103 \pm 2$ )℃下烘干至恒重的无水葡萄糖 1g,精确至 0.1mg,用水溶解并定容至 100mL。

## A.2.5 葡萄糖标准使用溶液

分别吸取葡萄糖标准贮备溶液 0.00、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50mL 于 10mL 容量瓶中,用水定容至 10mL,盖塞,摇匀备用。

上述系列浓度应根据需要自行调整。

A.2.6 快速定性滤纸(杭州新华一号滤纸)  $\phi 15$ cm (每批滤纸,使用前用标准酶加以校正)。

## A.3 仪器

除普通实验室仪器外,还应有:

## A.3.1 分光光度计

A.3.2 酸度计 精度  $\pm 0.01$  pHA.3.3 恒温水浴 ( $50 \pm 0.1$ )℃

## A.3.4 分析天平 感量 0.1mg

## A.3.5 磁力搅拌器

## A.3.6 秒表或定时钟

## A.3.7 沸水浴(可用 800W 电炉和高脚烧杯、搪瓷量杯或其他容器组成)

## A. 3.8 具塞刻度试管 25mL

## A. 4 分析步骤

## A. 4.1 绘制标准曲线

按表 A.1 规定的量, 分别吸取葡萄糖标准使用溶液(A.2.5)、缓冲溶液(A.2.2 或 A.2.3)和 DNS 试剂(A.2.1)于各管中(每管号平行作 3 个样), 混匀。

将标准管同时置于沸水浴中, 反应 10 min。取出, 迅速冷却至室温, 用水定容至 25 mL, 盖塞, 混匀。用 10 mm 比色杯, 在分光光度计波长 540 nm 处测量吸光度。以葡萄糖量为横坐标, 以吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 获得线性回归方程, 线性回归系数应在 0.9990 以上时方可使用(否则须重做)。

表 A.1 葡萄糖标准曲线

管 号	葡萄糖标准使用溶液		缓冲液吸取量 mL	DNS 试剂吸取量 mL
	浓 度 mg/mL	吸 取 量 mL		
0	0.0	0.00	2.0	3.0
1	1.0	0.50	1.5	3.0
2	1.5	0.50	1.5	3.0
3	2.0	0.50	1.5	3.0
4	2.5	0.50	1.5	3.0
5	3.0	0.50	1.5	3.0
6	3.5	0.50	1.5	3.0

## A. 4.2 样品的测定

## A. 4.2.1 待测酶液的制备

称取固体酶样 1 g, 精确至 0.1 mg(或吸取液体酶样 1 mL, 精确至 0.01 mL), 用水溶解, 磁力搅拌混匀, 准确稀释定容(使试样液与空白液的吸光度之差恰好落在 0.3~0.4 范围内), 放置 10 min, 待测。

## A. 4.2.2 滤纸条的准备

- 将待用滤纸放入(硅胶)干燥器中平衡 24 h;
- 将水分平衡后的滤纸制成宽 1 cm、质量为  $(50 \pm 0.5)$  mg 的滤纸条, 折成 M 型, 备用。

## A. 4.3 操作程序

- 取四支 25 mL 刻度具塞试管(一支空白管, 三支样品管)。
- 将折成 M 型的滤纸条, 分别放入每支试管的底部(沿 1 cm 方向竖直放入)。
- 分别向四支管中, 准确加入相应 pH 的缓冲溶液(A.2.2 或 A.2.3) 1.50 mL。
- 分别准确加入稀释好的待测酶液(A.4.2.1) 0.50 mL 于三支样品管中(空白管不加), 使管内溶液浸没滤纸, 盖塞。
- 将四支试管同时置于  $(50 \pm 0.1)$  °C 水浴中, 准确计时, 反应 60 min, 取出。
- 立即准确地向各管中加入 DNS 试剂(A.2.1) 3.0 mL。再于空白管中准确加入稀释好的待测酶液(A.4.2.1) 0.50 mL, 摇匀。将四支管同时放入沸水浴中, 加热 10 min, 取出, 迅速冷却至室温, 加水定容至 25 mL, 摇匀。
- 以空白管(对照液)调仪器零点, 在分光光度计波长 540 nm 下, 用 10 mm 比色杯, 分别测量三支平行管中样液的吸光度, 取平均值。以吸光度平均值查标准曲线或用线性回归方程求出还原糖的含量。



#### A.5 结果计算

FPA 酶活力按式 (A.1) 计算。

$$X_1 = A \times 1/0.5 \times n \quad \cdots \cdots \cdots (A.1)$$

式中:

$X_1$  ——样品的滤纸酶活力 (FPA), u/g (或 u/mL);

$A$  ——根据吸光度在标准曲线上查得 (或计算出) 的还原糖量, mg;

1/0.5 ——换算成酶液 1 mL;

$n$  ——酶样的稀释倍数。

#### A.6 允许差

同一试样两次测试结果的绝对差值, 不得超过算术平均值的 10%。变异系数不超过 10%。

## 附 录 B (规范性附录)

### 羧甲基纤维素（还原糖法）酶活力（CMCA-DNS）测定方法

#### B.1 原理

纤维素酶在一定温度和 pH 条件下，将纤维素底物（羧甲基纤维素钠）水解，释放出还原糖。在碱性、煮沸条件下，3,5-二硝基水杨酸（DNS 试剂）与还原糖发生显色反应，其颜色的深浅与还原糖（以葡萄糖计）含量成正比。通过在 540nm 测其吸光度，可得到产生还原糖的量，计算出纤维素酶的 CMCA-DNS 酶活力。以此代表纤维素酶的酶活力。

#### B.2 试剂和溶液

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

##### B.2.1 羧甲基纤维素钠（CMC-Na）

化学纯（上海光华化学试剂厂） 在 25℃，2% 水溶液，粘度 800 mPa·s~1200 mPa·s。（每批羧甲基纤维素钠使用前用标准酶加以校正）。

##### B.2.2 柠檬酸钠缓冲液，0.05 mol/L pH 4.8（适用于酸性纤维素酶）

称取一水柠檬酸 4.83 g，溶于约 750 mL 水中，在搅拌情况下，加入柠檬酸三钠 7.94 g，用水定容至 1000 mL，调节溶液的 pH 到 (4.8±0.05) 备用。

注：也可采用 pH 4.8 乙酸缓冲液：称取三水乙酸钠 8.16 g，溶于约 750 mL 水中，加入乙酸 2.31 mL，用水定容至 1000 mL，调节溶液的 pH 到 (4.8±0.05) 备用。

##### B.2.3 磷酸缓冲液，0.1 mol/L pH 6.0（适用于中性纤维素酶）

分别称取一水磷酸二氢钠 121.0 g 和二水磷酸氢二钠 21.89 g，将其溶解在 10 L 去离子水中。调节溶液的 pH 到 (6.0±0.05)，备用。溶液在室温下可保存一个月。

##### B.2.4 CMC-Na 溶液

称取 2 g CMC-Na，精确至 1 mg，缓缓加入相应的缓冲液（B.2.2 或 B.2.3）约 200 mL 并加热至 80℃~90℃，边加热边磁力搅拌，直至 CMC-Na 全部溶解，冷却后用相应的缓冲液稀释至 300 mL，用 2 mol/L 盐酸或氢氧化钠调节溶液的 pH 到 (4.8±0.05)（酸性纤维素酶）或 (6.0±0.05)（中性纤维素酶），最后定容到 300 mL，搅拌均匀，贮存于冰箱中备用。

##### B.2.5 DNS 试剂

称取 3,5-二硝基水杨酸 (10±0.1) g，置于约 600 mL 水中，逐渐加入氢氧化钠 10 g，在 50℃ 水浴中（磁力）搅拌溶解后，再依次加入酒石酸钾钠 200 g、苯酚（重蒸）2 g 和无水亚硫酸钠 5 g，待全部溶解并澄清后，冷却至室温，用水定容至 1000 mL，过滤。贮存于棕色试剂瓶中，于暗处放置 7 d 后使用。

##### B.2.6 葡萄糖标准贮备溶液（10 mg/mL）

称取于 (103±2)℃ 下烘干至恒重的无水葡萄糖 1 g，精确至 0.1 mg，用水定容至 100 mL。

##### B.2.7 葡萄糖标准使用溶液

分别吸取葡萄糖标准贮备溶液 0.00、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50 mL 于 10 mL 容量瓶中，用水定容至 10 mL，盖塞，摇匀备用。

上述系列浓度应根据需要自行调整。

**B.3 仪器****B.3.1 自动连续多档分配器****B.3.2 漩涡混合器****B.3.3 试管、水浴等仪器 同 A.3****B.4 分析步骤****B.4.1 绘制标准曲线**

按表 B.1 规定的量,分别吸取葡萄糖标准使用溶液(B.2.7)、缓冲溶液(B.2.2 或 B.2.3)和 DNS 试剂(B.2.5)于各管中(每管号平行作 3 个样),混匀。

将标准管同时置于沸水浴中,反应 10 min。取出,迅速冷却至室温,用水定容至 25 mL,盖塞,混匀。用 10 mm 比色杯,在分光光度计波长 540 nm 处测量吸光度。以葡萄糖量为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,获得线性回归方程,线性回归系数应在 0.9990 以上时方可使用(否则须重做)。

**表 B.1 葡萄糖标准曲线**

管 号	葡萄糖标准使用溶液		缓冲液吸取量 mL	DNS 试剂吸取量 mL
	浓 度 mg/mL	吸 取 量 mL		
0	0.0	0.00	2.5	3.0
1	1.0	0.50	2.0	3.0
2	1.5	0.50	2.0	3.0
3	2.0	0.50	2.0	3.0
4	2.5	0.50	2.0	3.0
5	3.0	0.50	2.0	3.0
6	3.5	0.50	2.0	3.0

**B.4.2 样品的测定****B.4.2.1 待测酶液的制备**

称取固体酶样 1 g,精确至 0.1 mg(或吸取液体酶样 1.0 mL,精确至 0.01 mL),用水溶解,准确稀释定容(使试样液与空白液的吸光度之差恰好落在 0.33~0.35 范围内),混匀放置 10 min,待测。

**B.4.2.2 操作程序**

- 取四支 25 mL 刻度具塞试管(一支空白管,三支样品管)。
- 分别向四支管中,准确加入用相应 pH 缓冲溶液配制的 CMC-Na 溶液(B.2.4)2.00 mL。
- 分别准确加入稀释好的待测酶液(B.4.2.1)0.50 mL 于三支样品管中(空白管不加),用漩涡混匀器混匀,盖塞。
- 将四支试管同时置于(50±0.1)℃水浴中,准确计时,反应 30 min,取出。
- 迅速、准确地向各管中加入 DNS 试剂(B.2.5)3.0 mL,于空白管中准确加入稀释好的待测酶液(B.4.2.1)0.50 mL,摇匀。将四支管同时放入沸水浴中,准确计时,加热 10 min,取出,迅速冷却至室温,用水定容至 25 mL。
- 以空白管(对照液)调仪器零点,在分光光度计波长 540 nm 下,用 10 mm 比色杯,分别测量三支样品管中样液的吸光度,取平均值。通过查标准曲线或用线性回归方程求出还原糖的含量。

**B.5 CMCA-DNS 酶活力计算**

CMCA-DNS 酶活力, 按式 (B.1) 计算。

$$X_1 = A \times 1/0.5 \times n \times 2 \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

$X_1$  —— 羧甲基纤维素 (还原糖法) 酶活力 (CMCA-DNS), u/g (或 u/mL);

$A$  —— 吸光度在标准曲线上查得 (或计算出) 的还原糖量, mg;

1/0.5 —— 换算成酶液 1 mL;

$n$  —— 酶样的稀释倍数;

2 —— 时间换算系数。

**B.6 允许差**

同一试样两次测试结果的绝对差值, 不得超过算术平均值的 10%。变异系数不超过 5%。

附 录 C  
(规范性附录)

羧甲基纤维素(粘度法)酶活力(CMCA-VIS)测定方法

C.1 原理

纤维素酶在一定温度和 pH 条件下,将羧甲基纤维素钠降解,底物粘度随之降低,粘度的降低与内切纤维素酶活性成正比。通过粘度计测得的数值与指定已知酶活的标准酶样品比较,换算出待测纤维素酶样的相对酶活力(以内切酶活力为主)。

C.2 试剂和溶液

C.2.1 柠檬酸钠缓冲液, 0.1 mol/L pH6.0 (酸性纤维素酶适用)

分别称取一水磷酸二氢钠 121.0 g 和二水磷酸氢二钠 21.89 g, 将其溶解在去离子水 10 L 中。调节溶液的 pH 到  $(6.0 \pm 0.05)$  备用。溶液在室温下可保存一个月。

C.2.2 磷酸缓冲液, 0.1 mol/L pH7.5 (中性纤维素酶适用)

分别称取一水磷酸二氢钠 22.49 g、二水磷酸氢二钠 148.98 g 和 PEG 6000 (聚乙二醇) 10.0 g, 将其溶解在去离子水 10 L 中。调节溶液的 pH 到  $(7.5 \pm 0.05)$  备用。溶液在室温下可保存一个月。

C.2.3 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)

BLANOSE 7LF(Hercules Incorporated) 在 25℃, 取代度 65%~90%, 2% 水溶液, 粘度 20 mPa·s~50 mPa·s。

C.2.4 CMC-Na 溶液

称取 35 g CMC-Na, 精确至 1 mg, 缓缓加入相应的缓冲液(C.2.1 或 C.2.2)约 700 mL 并加热至 80℃~90℃。边加热边磁力搅拌, 直至 CMC-Na 全部溶解。冷却后用相应的缓冲液(C.2.1 或 C.2.2)加至 950 mL, 用 2 mol/L 的盐酸或氢氧化钠调节溶液的 pH 到  $(6.0 \pm 0.05)$  (酸性纤维素酶)或  $(7.5 \pm 0.05)$  (中性纤维素酶), 最后定容到 1000 mL 缓冲液, 搅拌均匀, 贮存于冰箱中备用。

在冰箱中的贮存使用期, 最长为 3 d。

使用前应校正 pH 至相应的范围。

C.2.5 标准酶(酸性或中性)

C.3 仪器

C.3.1 振荡粘度计 MIVI 8004 (Sofraser, France) 或同等分析效果的仪器。

C.3.2 恒温水浴  $(50 \pm 0.1)^\circ\text{C}$

C.3.3 漩涡混合器

C.3.4 10 mL 塑料试管(100 mm×13 mm)

C.3.5 高精度自动分配器

C.3.6 秒表

C.4 分析步骤

C.4.1 粘度计的校准

使用标准粘度样品校准粘度计。100 mPa·s, 数值显示在  $(1800 \pm 50)$  mV; 10 mPa·s, 数值显示在  $(750 \pm 10)$  mV。

#### C.4.2 标准曲线的制备

称取一定量的酸性或中性标准酶，用相应的缓冲溶液(C.2.1或C.2.2)溶解，作为标准贮备液。然后将该贮备液梯度按表C.1或表C.2稀释到最终浓度作为酶标准使用溶液备用。酶标准贮备液和使用溶液每日应重新配制。

注：表C.1和C.2中酶标准使用溶液的浓度，应依据所用标准酶的不同而不同。

表 C.1 酸性纤维素酶标准曲线

标准点	酸性标准品酶活力 $\mu\text{mL}$	酶标准贮备液 $\text{mL}$	柠檬酸钠缓冲液 (C.2.1)
1	0.000	0.0	加至 100 mL
2	0.270	5.0	加至 100 mL
3	0.378	7.0	加至 100 mL
4	0.540	10.0	加至 100 mL
5	0.648	12.0	加至 100 mL
6	0.810	15.0	加至 100 mL
7	1.080	20.0	加至 100 mL

表 C.2 中性纤维素酶标准曲线

标准点	中性标准品酶活力 $\mu\text{mL}$	酶标准贮备液 $\text{mL}$	磷酸缓冲液 (C.2.2)
1	0.00	0.0	加至 100 mL
2	3.02	3.0	加至 100 mL
3	4.03	4.0	加至 100 mL
4	5.04	5.0	加至 100 mL
5	6.04	6.0	加至 100 mL
6	7.05	7.0	加至 100 mL
7	10.07	10.0	加至 100 mL

#### C.4.3 标准对照酶样的制备

称取一定量的标准对照酶样，精确至 1mg，用与溶解相应标准酶同样的缓冲液(C.2.1或C.2.2)溶解。

标准对照酶样溶液的浓度，应根据配制的酶标准使用溶液的浓度范围进行调整，使稀释后对照样的酶活恰好落在标准曲线的中部。

#### C.4.4 待测酶液的制备

称取少量酶样，用相应的缓冲液(C.2.1或C.2.2)溶解，磁力搅拌 15 min，并稀释到一定体积，使稀释后样液的酶活恰好落在标准曲线的中部。

#### C.4.5 操作程序

取若干支专用试管。按表C.3规定，分别吸取各种溶液于各管中(每种样液平行作3个)。每个试管操作间隔应以秒表准确控制相同的时间，按放入顺序依次取出试管，迅速插入振荡粘度计(插入时粘度计切忌碰试管壁)，读数。

表 C.3 实验步骤

每个试管加入缓冲液 (C.2.1 或 C.2.2)	0.375 mL (空白管 0.500 mL)
分别加入酶标准使用溶液 (表 C.1 或表 C.2)、酶标准对照溶液 (C.2.4)、样液	0.125 mL
依次加入 CMC-Na 底物, 混匀 10 s (漩涡混合器, 200 r/min)	4.000 mL
依次放入 40℃ 水浴保温	30 min
振荡粘度计测量体系粘度变化	
记录读数	
注 1: 每做完一个样, 振荡棒要擦拭干净。 注 2: 严格控制各管之间的时间。	

C.5 结果计算

C.5.1 标准曲线的绘制

以酶标准使用溶液的酶活力为横坐标, 以读取的粘度计读数 (mV) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 获得线性回归方程, 线性回归系数大于 0.997 5 以上时方可使用 (否则须重做)。

C.5.2 CMCA-VIS 酶活力的计算

CMCA-VIS 酶活力, 按式 (C.1) 计算。

$$X_1 = \frac{c \times V \times n}{m} \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

- $X_1$  —— 羧甲基纤维素 (粘度法) 酶活力 (CMCA-VIS), u/g (或 u/mL);
- $c$  —— 通过标准曲线查得 (计算出) 的酶活力, u/g (或 u/mL);
- $V$  —— 容量瓶的体积, mL;
- $n$  —— 进一步稀释的倍数;
- $m$  —— 称取 (或吸取) 样品的量, g (或 mL)。

C.6 允许差

同一试样两次测试结果的绝对差值, 不得超过算术平均值的 10%。变异系数不超过 10%。

**附 录 D**  
(资料性附录)  
**与国际酶活力单位的换算**

**D.1 国际纤维素酶活力单位定义**

在  $(50 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 、相应 pH 条件下, 1 min 水解纤维素底物, 产生出相当于  $1\ \mu\text{mol}$  葡萄糖的还原糖量, 为 1 个酶活力单位, 以 IU/g (或 IU/mL) 表示。

**D.2 换算公式**

将附录 A 或附录 B 测得的纤维素酶活力单位(mg/h),按公式(D.1)换算成为国际单位( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )。

$$X_1 = \frac{X_2 \times 1000}{180 \times 60} = 0.093 X_2 \quad \dots\dots\dots (\text{D.1})$$

式中:

$X_1$  —— 国际纤维素酶活力, IU/g (或 IU/mL);

180 —— 还原糖的摩尔质量 (以葡萄糖计), g/mol;

60 —— 时间换算系数, s/min;

$X_2$  —— 用附录 A 或附录 B 测得的纤维素酶活力, u/g (或 u/mL)。