ICS 65.120
B 46

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 23874—2009

# 饲料添加剂木聚糖酶活力的测定 分光光度法

**Determination of xylanase activity in feed additives—Spectrophotometric method**

2009-05-26 发布　　2009-10-01 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

食品伙伴网http://www.foodmate.net

# 前　言

本标准的附录A为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准由中国农业大学农业部饲料工业中心、武汉新华扬生物有限公司、广东溢多利生物技术股份有限公司负责起草。

本标准主要起草人：陆文清、曹云鹤、刘兴海、詹志春、刘亚力、陈清华。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

# 饲料添加剂木聚糖酶活力的测定 分光光度法

## 1 范围

本标准规定了用分光光度法测定饲料添加剂中木聚糖酶的活力。

本标准适用于饲料添加剂木聚糖酶产品，最低检出量为 10.0 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 原理

木聚糖酶能将木聚糖降解成寡糖和单糖。还原性寡糖和单糖在沸水浴条件下可以与 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂发生显色反应。反应液颜色的深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木聚糖酶的活力成正比。因此，通过分光比色测定反应液颜色的强度，可以计算反应液中木聚糖酶的活力。

在 37 ℃、pH 为 5.50 的条件下，每分钟从浓度为 5 mg/mL 的木聚糖溶液中降解释放 1 μmol 还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位 U。

## 4 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。

**4.1 氢氧化钠溶液，浓度为 200 g/L**

称取氢氧化钠 20.0 g。加水溶解，定容至 100 mL。

**4.2 乙酸溶液，浓度为 0.1 mol/L**

吸取冰乙酸 0.60 mL。加水溶解，定容至 100 mL。

**4.3 乙酸钠溶液，浓度为 0.1 mol/L**

称取三水乙酸钠 1.36 g。加水溶解，定容至 100 mL。

**4.4 乙酸-乙酸钠缓冲溶液，浓度为 0.1 mol/L，pH 为 5.50**

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 5.50，再用乙酸溶液(4.2)或乙酸钠溶液(4.3)调节至 5.50。

**4.5 木糖溶液($C_5H_{10}O_5$)，浓度为 10.0 mg/mL**

称取无水木糖 1.000 g，加乙酸-乙酸钠缓冲溶液(4.4)溶解，定容至 100 mL。

**4.6 木聚糖溶液，浓度为 100 mg/mL**

称取木聚糖(Sigma X0627[1])1.00 g，加入 0.32 g 氢氧化钠，再加入 90 mL 水，磁力搅拌，同时缓慢

1) Sigma X0627 是商品名，给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他产品能有相同的效果，则可使用这些等效的产品。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

加热，直至木聚糖完全溶解。然后停止加热，继续搅拌 30 min，加入 0.5 mL 冰乙酸。继续磁力搅拌，测定其 pH。如果 pH 为 5.50，用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(4.4)定容至 100 mL。如果 pH 偏离5.50，再用乙酸溶液(4.2)或乙酸钠溶液(4.3)调节至 5.50，然后再用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(4.4)定容至100 mL。使用前适当摇匀。4 ℃避光保存，有效期为 12 h。

**4.7 DNS 试剂**

称取 3,5-二硝基水杨酸 3.15 g，加水 500 mL，搅拌 3 s～5 s，水浴至 45 ℃。然后逐步加入 100 mL 氢氧化钠溶液(4.1)，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 后方可使用，有效期为 180 d。

## 5 仪器与设备

5.1 实验室用样品粉碎机或碾钵。

5.2 分样筛：孔径为 0.25 mm。

5.3 分析天平：感量 0.001 g。

5.4 pH 计：精确至 0.01。

5.5 磁力搅拌器：附加热功能。

5.6 电磁振荡器。

5.7 烧结玻璃过滤器：孔径为 0.45 μm。

5.8 离心机：最大离心加速度不小于 2 000 *g*。

5.9 恒温水浴锅：温度控制范围在 30 ℃～60 ℃之间，精度为 0.1 ℃。

5.10 秒表：每小时误差不超过 5 s。

5.11 可见分光光度计。

5.12 移液器：精度为 1 μL。

## 6 绘制标准曲线

6.1 吸取乙酸-乙酸钠缓冲溶液(4.4)4.0 mL，加入 DNS 试剂(4.7)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。

6.2 分别吸取木糖溶液(4.5)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(4.4)定容至 100 mL，配制成浓度为 0.10 mg/mL、0.20 mg/mL、0.30 mg/mL、0.40 mg/mL、0.50 mg/mL、0.60 mg/mL 和 0.70 mg/mL 木糖标准溶液。

6.3 分别吸取上述浓度系列的木糖标准溶液各 2.00 mL(做两个平行)，分别加入到刻度试管中，再分别加入 2.0 mL 缓冲液(4.4)和 5.0 mL DNS 试剂(4.7)。电磁振荡 3 s～5 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 *A* 值。

以木糖浓度为 Y 轴、吸光度 A 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。

## 7 反应用酶液的制备

### 7.1 固体样品的反应用酶液制备

按照附录 A 中建议的称样量称取试样两份，精确至 0.001 g。加入 40 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液



食品伙伴网http://www.foodmate.net

(4.4)。磁力搅拌 30 min,再用缓冲溶液(4.4)定容至 100 mL,在 4 ℃条件下避光保存 1 h～2 h。上离心机(5.8)1 000$g$ 离心 3 min～5 min,取上清液,再用缓冲溶液(4.4)做适当稀释(稀释后的待测酶液中木聚糖酶活力最好能控制在 0.04 U/mL～0.10 U/mL 之间)。

### 7.2 液体样品的反应用酶液制备

液体样品可以直接用乙酸-乙酸钠缓冲溶液(4.4)进行稀释、定容(稀释后的酶液中木聚糖酶活力最好能控制在 0.04 U/mL～0.10 U/mL 之间)。如果稀释后酶液的 pH 偏离 5.50,需要用乙酸溶液(4.2)或乙酸钠溶液(4.3)调节校正至 5.50,然后再用缓冲溶液(4.4)做适当稀释定容。

## 8 测定步骤

吸取 10.0 mL 木聚糖溶液(4.6),37 ℃平衡 20 min。

吸取 10.0 mL 经过适当稀释的酶液(7.1 或 7.2),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(4.7),电磁振荡 3 s～5 s。然后加入 2.0 mL 木聚糖溶液(4.6),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～5 s。以标准空白样(6.1)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 木聚糖(4.6)(已经过 37 ℃平衡),电磁振荡 3 s～5 s,37 ℃精确保温 30 min。加入 5.0 mL DNS 试剂(4.7),电磁振荡 3 s～5 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～5 s。以标准空白样(6.1)为空白对照,在 540 nm 处测定吸光度 $A_E$。

## 9 试样酶活力的计算

用于酶解反应的稀释酶液中木聚糖酶的活力按式(1)和式(2)计算:

$$X_D = \frac{[(A_E - A_B) \times K + C_O]}{M \times t} \times 1\,000 \quad \cdots\cdots(1)$$

式中:

$X_D$——稀释酶液中木聚糖酶的活力,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;

$C_O$——标准曲线的截距;

$M$——木糖的摩尔质量,$M(C_5H_{10}O_5) = 150.2$ g/mol;

$t$——酶解反应时间,min;

1 000——转化因子,1 mmol = 1 000 μmol。

$X_D$ 值应在 0.04 U/mL～0.10 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。

$$X = X_D \times D_f \quad \cdots\cdots(2)$$

式中:

$X$——试样中木聚糖酶的活力,U/g(或 U/mL);

$D_f$——试样的稀释倍数。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

酶活力的计算值保留三位有效数字。

## 10 重复性

每个试样应取两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。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

# 附 录 A
## （资料性附录）
## 样品酶活力与建议称样量的对应关系

样品酶活力与建议称样量的对应关系见表 A.1：

表 A.1

| 木聚糖酶活力/(U/g)(或者 U/mL) | 称样量/g(或者 mL) |
|---|---|
| ≥2 000 | 0.1～0.2 |
| 500～1 999 | 0.2～0.5 |
| 200～499 | 0.5～1.0 |
| 50～199 | 1.0～2.0 |
| 10～49 | 2.0～5.0 |



食品伙伴网http://www.foodmate.net