



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

非淀粉多糖水解酶活力测定

Determination of activity for non-starch polysaccharide hydrolase

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国标准化研究院提出。

本文件由中国标准化研究院归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

非淀粉多糖水解酶活力测定

1 范围

本标准规定了非淀粉多糖水解酶活力测定的实验室基本要求、材料、试剂和仪器基本要求、取样要求、测定方法、实验人员以及记录与测试报告。

本标准适用于酶制剂原料（包括发酵液、粗提液、纯化液、成品）中的纤维素酶、 α -半乳糖苷酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、甘露聚糖酶和果胶酶的活力测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 1886.174 食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求
- GB/T 36861 饲料添加剂 β -甘露聚糖酶活力的测定 分光光度法
- GB/T 44738 饲用果胶酶活力的测定
- NY/T 912 饲料添加剂纤维素酶活力的测定 分光光度计法
- NY/T 4361 饲料添加剂 α -半乳糖苷酶活力的测定 分光光度计法
- QB/T 4481 β -葡聚糖酶制剂

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 非淀粉多糖 non-starch polysaccharide

植物组织中若干单糖通过糖苷键组成的多糖聚体，是除了淀粉以外的其他多糖类物质，主要由纤维素、果胶、半纤维素等组成。

3.2 非淀粉多糖水解酶 non-starch polysaccharide hydrolase

能够催化非淀粉多糖中的糖苷键断裂，产生单糖或寡糖的一系列酶，主要包括纤维素酶、 α -半乳糖苷酶、木聚糖酶、 β -葡聚糖酶、甘露聚糖酶、果胶酶等。

3.3 纤维素酶 cellulase

能降解纤维素生成纤维寡糖、纤维二糖和葡萄糖的水解酶。

3.4 α -半乳糖苷酶 α -galactosidase

能催化 α -半乳糖苷键水解的糖苷水解酶。

3.5

木聚糖酶 xylanase

能破坏植物的纤维组织，将木聚糖分解成木糖的水解酶。

3.6

β-葡聚糖酶 β-glucanase

能催化β-葡聚糖的β-1,3糖苷键或β-1,3和β-1,4糖苷键的水解酶。

3.7

甘露聚糖酶 mannanase

能催化甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘露聚糖中β-1,4-甘露糖苷键的水解酶。

3.8

果胶酶 pectinase

能水解果胶，生成含有还原性基团产物的酶。

4 实验室基本要求

4.1 实验室应符合 GB/T 27025 的规定。

4.2 实验室宜区分以下功能区域：

- a) 样品制备区：用于底物溶解、酶液稀释，配备超纯水系统和无菌操作台；
- b) 反应控制区：放置恒温设备，避免振动和光照干扰；
- c) 分析检测区：独立分光光度计操作台，避免灰尘污染光路；
- d) 数据记录区：与实验区域隔离，防止电子设备干扰精密仪器。

4.3 实验室应配备应急处理设施，包括洗眼器、急救箱及防毒面具。

4.4 实验室应建立废物处理制度，分类收集化学废液、生物废料及一次性耗材，并委托专业机构处置。

5 材料、试剂和仪器基本要求

5.1 实验耗材、试剂应从经过资质机构认可的厂家货供应商采购，必要时对供应商进行评估。

5.2 实验耗材、试剂在使用前进行质量检查。

5.3 实验室仪器应定期进行维护和校准，校准周期宜不超过 12 个月。

5.4 应严格按照操作规程使用仪器。

6 取样要求

6.1 一般要求

6.1.1 取样人员应对手部、取样口及周围环境进行消毒。

6.1.2 应使用无菌、洁净的专用取样器具，器具所用材质不应对酶活力产生影响。

6.1.3 样品采集后应立即处理或测定，如需储存或输送，应置于冰浴或 4℃冰箱中冷藏，并在 4 小时内完成检测。

6.1.4 样品应及时加贴唯一的标签，标签内容应包括样品编号、样品名称、取样时间与人员，以及其他任何必要的信息。标签应防潮，书写的內容应不可擦除。

6.2 取样点

所取样品应具有代表性, 取样点包括但不限于发酵过程中规定的取样点、发酵终点、离心/过滤终点、浓缩终点、配制/混合终点。

6.3 取样频率

6.3.1 批次生产时, 每个生产批次应在规定的取样点至少取样一次。

6.3.2 连续生产时, 应每间隔 24 小时取样一次。

6.3.3 当设备调试、工艺变更或出现异常情况时, 应增加取样频率。

6.4 取样方法

6.4.1 固体样品: 称取适量样品 (精确至 0.0001 g) 至 100 mL 容量瓶中, 加入对应缓冲液溶解并定容, 搅拌 30 分钟。

6.4.2 液体样品: 移取适量样品 (精确至 0.0001 mL) 至 100mL 容量瓶中, 加入对应缓冲液溶解并定容, 搅拌 30 分钟。

6.5 取样量

应满足检测所需量的至少3倍, 一份用于检测, 一份用于备检, 一份用于留存。

7 测定方法

7.1 纤维素酶

纤维素酶活力按照NY/T 912规定的方法测定。

7.2 α -半乳糖苷酶

α -半乳糖苷酶活力按照NY/T 4361规定的方法测定。

7.3 木聚糖酶

木聚糖酶活力按照附录A规定的方法测定。

7.4 β -葡聚糖酶

β -葡聚糖酶活力按照QB/T 4481规定的方法测定。

7.5 甘露聚糖酶

甘露聚糖酶活力按照GB/T 36861规定的方法测定。

7.6 果胶酶

果胶酶活力按照GB 1866.174规定的方法测定。

8 实验人员

8.1 实验人员应穿戴个人防护装备。

8.2 实验人员应遵守化学试剂的储存、使用及废弃物处理规范。

8.3 实验人员应定期接受实验室安全管理制度和规程培训。

9 记录与测试报告

9.1 应记录实验的具体操作程序和结果，出具测试报告。

9.2 测试报告应至少包括如下内容：

- 实验样品的全部信息；
- 检测时间；
- 测试方法；
- 实验人员；
- 所有可能影响实验结果的操作细节；
- 测定结果；

9.3 应建立测试档案并妥善保存。

附录 A
(规范性)
木聚糖酶活力测定方法

A. 1 试剂和材料

除非另有说明, 试剂均为分析纯。

A. 1. 1 水: GB/T 6682, 三级。

A. 1. 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。

A. 1. 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。

A. 1. 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2000 mL。测定溶液的pH, 如果pH偏离5.50, 再用乙酸溶液 (A. 1. 2) 或乙酸钠溶液 (A. 1. 3) 调节至5.50。

A. 1. 5 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。

A. 1. 6 木糖溶液: 浓度为10.0 mg/mL。

称取无水木糖1 g (精确至0.0001 g), 加磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (A. 1. 4) 溶解, 定容至100 mL。

A. 1. 7 木聚糖溶液: 浓度为10.0 mg/mL。

称取木聚糖[上海源叶S25874¹⁾]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 (A. 1. 4) 定容至100 mL。如果pH偏离5.50, 再用乙酸溶液 (A. 1. 2) 或乙酸钠溶液 (A. 1. 3) 调节至5.50, 然后再用乙酸-乙酸钠缓冲溶液定容至100 mL。使用前适当摇匀。4 °C避光保存, 有效期为12 h。

A. 1. 8 DNS试剂

称取3, 5-二硝基水杨酸3.15 g, 加水500 mL, 搅拌3~5 s, 水浴至45 °C。然后逐步加入100 mL氢氧化钠溶液 (A. 1. 5), 同时不断搅拌, 直到溶液清澈透。注意: 在加入氢氧化钠过程中, 溶液温度不应超过48 °C。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 °C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1000 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天后可使用, 有效期为180天。

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

注: 可使用商品化的DNS试剂。

1) 上海源叶S25874是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件的使用者, 并不表示对这一产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果, 则可使用这些等效产品。

A. 2 仪器设备

- A. 2. 1 分光光度计：波长540 nm。
- A. 2. 2 分析天平：感量0.001 g和0.0001 g。
- A. 2. 3 离心机：转速不低于3000 r/min。
- A. 2. 4 pH计：精确值0.01。
- A. 2. 5 电热恒温干燥箱：103±2 °C。
- A. 2. 6 磁力搅拌器：附加热功能。
- A. 2. 7 恒温水浴锅：温度控制范围在30~80 °C之间，精度为0.1 °C。
- A. 2. 8 涡旋混合器：转速不低于300 rpm。
- A. 2. 9 移液枪：100 μL、1000 μL，精度1 μL。
- A. 2. 10 计时器：精度1 s。

A. 3 绘制标准曲线

- A. 3. 1 吸取乙酸-乙酸钠缓冲溶液（A. 2. 4）4.0 mL，加入DNS试剂（A. 2. 8）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。
- A. 3. 2 分别吸取木糖溶液（A. 1. 6）1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL、5.00 mL、6.00 mL和7.00 mL，分别用乙酸-乙酸钠缓冲溶液（A. 1. 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的木糖标准溶液。
- A. 3. 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乙酸-乙酸钠缓冲溶液（A. 1. 4）和5.0 mL DNS试剂（A. 1. 8），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。

A. 4 反应用酶液制备

A. 4. 1 固体样品的反应用酶液制备

称取试样两份，精确至0.0001 g。加入40 mL乙酸-乙酸钠缓冲溶液缓冲溶液（A. 1. 4）。搅拌30 min，再用乙酸-乙酸钠缓冲溶液定容至100 mL，在4 °C条件下避光保存1~2 h。用离心机1000 g离心3~5 min，再用乙酸-乙酸钠缓冲溶液做适当稀释（稀释后的待测酶液中木聚糖酶制剂活力应控制在0.04~0.10 U/mL之间）。

A. 4. 2 液体样品的反应用酶液制备

液体试样可直接用乙酸-乙酸钠缓冲溶液（A. 1. 4）进行稀释、定容（稀释后的酶液中木聚糖酶制剂活力宜控制在0.04~0.10 U/mL之间）。如果稀释后酶液的pH偏离5.50，需用乙酸溶液（A. 1. 2）或乙酸钠溶液（A. 1. 3）调节至5.50，然后再用乙酸-乙酸钠缓冲溶液做适当稀释定容。

A. 5 测定步骤

- A. 5. 1 吸取10.0 mL木聚糖溶液（A. 1. 7），37 °C水浴保温平衡20 min。
- A. 5. 2 吸取10.0 mL经过适当稀释的酶液，37 °C水浴保温平衡10 min。

A. 5. 3 吸取2.0 mL已经过37 °C平衡的适当稀释酶液，加入到刻度试管中，再加入5 mL DNS试剂(A. 1. 8)，电磁振荡3 s。然后加入2.0 mL已经过37 °C平衡的木聚糖溶液(A. 1. 7)，37 °C保温30 min后取出，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(A. 3. 1)为空白对照，在540 nm处测定吸光度 A_B 。

A. 5. 4 吸取2.00 mL经过已经过37 °C平衡的适当稀释的酶液，加入到刻度试管中，再加入已经过37 °C平衡2.0 mL木聚糖溶液（A. 1. 7），电磁振荡3 s，37 °C精确保温30 min，加入5.0 mL DNS试剂（A. 1. 8），电磁振荡3 s，以终止酶解反应。沸水浴加热5 min，用自来水冷至室温，加水定容至25 mL，电磁振荡3 s。以标准空白样（A. 3. 1）为空白对照，在540 nm测定吸光度 A_E 。

A. 6 结果计算

试样稀释液中的木聚糖酶活力按公式（1）计算：

式中：

X_D ——样品的木聚糖酶活力, 单位为U/mL或U/g表示。

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；

Co——标准曲线的截距, 单位为厘米 (cm);

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, 单位为分钟 (min);

1.808——换算系数；

1000—转化因子, 1 mmol=1000 μmol。

A.7 重复性

在重复性条件下，两次独立测定结果绝对值差值不得超过其算数平均值的10%。