###

发布

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

非淀粉多糖水解酶活力测定

**Determination of non-starch polysaccharide hydrolase activity**

（征求意见稿）



发布

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

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

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的一种通用测定方法，包括仪器和设备、试剂和材料、试验步骤和结果分析。

本标准适用于纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶和β-葡聚糖酶等常见的单一及复合非淀粉多糖水解酶制剂的活性测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 5009.7 食品中还原糖的测定

GB/T 6682 分析实验用水规格和试验方法

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

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

能催化纤维素、β-葡聚糖、果胶和木聚糖等非淀粉多糖底物中的糖苷键断裂，产生还原糖的一系列酶类，包括纤维素酶、β-葡聚糖酶、果胶酶、木聚糖酶等单一及其复合酶。

3.2

酶活力单位 enzyme activity unit

在45 ℃，pH 5.50，反应60 min的条件下，每分钟降解滤纸试样释放1μmol还原糖所需要的酶量为1个酶活单位，以U表示。

4 原理

单一及复合的非淀粉多糖水解酶制剂可以水解滤纸，木聚糖、β-葡聚糖和果胶产生还原糖。还原糖在沸水浴条件下可以将3,5-二硝基水杨酸（DNS）还原成棕红色的氨基化合物（3-氨基-5-硝基水杨酸）。该化合物在540 nm波长下有最大吸收。在一定范围内，该吸光度与还原糖含量呈一定的线性关系。而还原糖的生成量又与单一及复合的非淀粉多糖水解酶的活力成正比。因此，通过分光光度法测定反应液在540 nm的吸收强度，可以计算单一及复合的非淀粉多糖水解酶的活力。

5 试剂和材料

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

5.4 200 g/L氢氧化钠溶液

称取20.0 g氢氧化钠，加水溶解，定容至100 mL。

5.5 0.1 mol/L乙酸溶液

量取0.60 mL冰乙酸，加水稀释，定容至100 mL。

5.6 0.1 mol/L乙酸钠溶液

称取1.36 g三水乙酸钠，加水溶解，定容至100 mL。

5.7 0.1 mol/L乙酸-乙酸钠缓冲溶液，pH = 5.5

准确称取23.14g三水乙酸钠，加冰乙酸1.70 mL，加水溶解，定容至2 000 mL。测定溶液pH，若pH偏离5.5，则用0.1 mol/L的乙酸溶液（5.5）或0.1 mol/L的乙酸钠溶液（5.6）调节pH至5.5。

5.8 10 mg/mL葡萄糖标准储备液

称取烘干至恒重的无水葡萄糖 (5.2) 1.000 g, 加水溶解，定容至100 mL。

5.9 3,5-二硝基水杨酸试剂（DNS 试剂）

准确称取 3,5-二硝基水杨酸 3.15 g，加水 500 mL 搅拌溶解，水浴至 45℃，然后逐渐加入氢氧化钠溶液（5.4）100 mL，边加边搅拌，直至完全溶解（温度不要超过48℃），再逐步加入酒石酸钾钠 91.0 g，苯酚 2.50 g和亚硫酸钠 2.50 g，搅拌至溶解，冷却至室温后，定容至1 000 ml。过滤，将滤液储存在棕色瓶中，避光保存。室温下存放 7 天后方可使用，有效期为 6 个月。

**警告：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。**

6 仪器与设备

6.1 分析天平：精度0.001g。

6.2 pH计：精确至0.01。

6.3 离心机：最小转速不小于1000 ×g。

6.4 恒温水浴锅：温度控制范围在30℃ ~ 60℃之间，精度为0.1℃。

6.5 移液枪：精度为1μL。

6.6 定性滤纸：快速定性滤纸孔径8-15um，直径9 cm。

7 分析步骤

7.1 绘制标准曲线

7.1.1 分别吸取葡萄糖标准储备液（5.8）0.00、0.20、0.40、0.80、1.00、1.20、1.60、2.00 mL于10 mL容量瓶中，用水定容至 10.0 mL，配置成浓度为 0.00 mg/mL~ 2.00 mg/mL 的葡萄糖标准系列。

7.1.2 分别吸取葡萄糖标准溶液（7.1.1）各1.0 mL于25 mL具塞玻璃试管中，加去离子水2.0 mL和DNS试剂（5.9）2.0 mL于各管中（每管3个平行），混匀。将标准管同时置于沸水浴中，反应5 min，流水冷却，蒸馏水定容至25.0 mL，混匀。测量540 nm处吸光度。以葡萄糖质量为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，获得线性回归方程。

7.2 酶制剂溶液准备

固体样品：参见附录A称取适量待测酶制剂试样，精确至0.001 g。加入40.0 mL乙酸-乙酸钠缓冲溶液（5.7），低温磁力搅拌30 min，再用缓冲溶液（5.7）补充至100.0 mL，在4℃下避光静置1h。混匀后，1000 ×g，4℃，离心 3 ~ 5 min。取上清，再用缓冲溶液（5.7）做二次稀释（稀释后的待测酶液酶活应控制在0.04 U/mL ~ 0.1 U/mL），并用乙酸（5.5）或乙酸钠溶液（5.6）调节pH为5.5。

液体样品：直接用乙酸-乙酸钠缓冲溶液（5.7）按标识酶活力进行适当稀释，使稀释后酶活控制在0.04 U/mL ~ 0.1 U/mL，并用乙酸（5.5）或乙酸钠溶液（5.6）调节pH 为5.5。

7.3 酶制剂溶液活性测定

7.3.1 吸取10.0 mL经过适当稀释的待测酶液（7.2），45℃平衡10 min。

7.3.2 在25 mL具塞比色管中加入滤纸片。定性滤纸（6.10）须对称剪成32 片并全部放入，加1.0 mL乙酸-乙酸钠缓冲溶液（5.7）浸润滤纸条，45℃水浴平衡10 min。

7.3.3 实验组：在平衡后的滤纸片（7.3.2）中依次加入0.50 mL待测酶液（7.3.1），5.0 mL水，振荡3s~5s，45 ℃水浴保温60 min，加2.0 mL DNS试剂（5.9），然后沸水浴煮沸5 min，自来水冷却至室温，加水定容至25.0 mL。在540 nm处测吸光度A1。

7.3.4 对照组：在平衡后的滤纸片（7.3.2）中依次加2.0 mL DNS试剂（5.9），0.50 mL 待测酶液（7.3.1）和5.0 mL水，振荡3s~5s，45 ℃水浴保温60 min，然后沸水浴煮沸5 min，自来水冷却至室温，加水定容至25.0 mL。在540 nm处测吸光度A0。

8 结果计算与分析

酶活力按照式（1）计算：

$X=\frac{m}{(M×t)}×1000×n$…………………………………….…….（1）

式中：

X——非淀粉多糖水解酶的酶活力（U）；

m——根据标准曲线方程上计算得的 (A1-A0)值对应的葡萄糖的质量（mg）；

M——葡萄糖的摩尔质量（180.2 g/mol）；

t——酶解反应时间（min）；

1000——转化因子，1 mmol = 1000μmol；

n ——酶制剂稀释倍数。

平行重复测定至少3次，以平行样的平均值为最终的酶活力，计算结果保留到小数点后两位。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对值差值不得超过算数平均值的10%。

**附录A**

**（资料性附录）**

**样品酶活力与建议称取量对应关系**

表A.1.样品酶活力与建议称取量对应关系。

|  |  |
| --- | --- |
| 非淀粉多糖水解酶活力/（U/g）（或者U/mL） | 称取量/g （或者mL） |
| ≥ 2 000 | 0.1 ~ 0.2 |
| 50 ~ 1 999 | 0.2 ~ 0.5 |
| 200 ~ 499 | 0.5 ~ 1.0 |
| 50 ~ 199 | 1.0 ~ 2.0 |
| 10 ~ 49 | 2.0 ~ 5.0 |

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_